

ALKOHOL-DEHYDROGENASE

aus Larven der Zuckmücke *Chironomus tentans*:

Isolierung und Charakterisierung

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

dem Fachbereich Biologie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Etti Harms

aus Leer

1972

ALKOHOL-DEHYDROGENASE

aus Larven der Zuckmücke *Chironomus tentans*:

Isolierung und Charakterisierung

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

dem Fachbereich Biologie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Etti Harms

aus Leer



1. Referent: Prof. Dr. K. Urich
2. Referent: Prof. Dr. E. -R. Lochmann

Tag der letzten mündlichen Prüfung:

8. 7. 1972

Diese Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. K. Urich am II. Zoologischen Institut der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Ich bin Herrn Prof. Dr. K. Urich für die Anregung, für die vielfältige Unterstützung und für die Anleitung zur kritischen Abfassung dieser Arbeit sehr zu Dank verpflichtet. Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Ass. - Prof. Dr. U. Reichert für zahlreiche anregende Diskussionen.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1.	Einleitung 1
2.	Material und Methoden 4
2.1	Tiermaterial 4
2.2	Präparation 4
2.3	Reagenzien 4
2.4	Bestimmung der ADH-Aktivität 5
2.5	Bestimmung der ADH-Aktivität mit Steroiden 5
2.6	Bestimmung des Proteingehaltes 6
2.7	Ammoniumsulfatfällung 6
2.8	Ionenaustauscher-Chromatographie 7
2.9	Gelfiltration 7
2.10	Elektrophorese 8
2.11	Stabilisierung der gereinigten Präparate 8
2.12	Durchführung der Messungen 8
3.	Ergebnisse und Diskussion 10
3.1	Aktivität der ADH verschiedener Spezies 10
3.2	Isolierung der ADH aus Larven von Chironomus tentans 14
3.3	Charakterisierung der gereinigten ADH aus Larven von Chironomus tentans 20
3.3.1	Zum Vorkommen von Isoenzymen 20
3.3.2	Stabilität der ADH 21
3.3.3	Reaktionskinetik 25
3.3.3.1	Enzymaktivität und -konzentration 25
3.3.3.2	Puffersystem 25
3.3.3.3	Abhängigkeit der ADH-Aktivität von der Coenzymkonzentration 27
3.3.3.4	Abhängigkeit der ADH-Aktivität von der Substratkonzentration 27

	<u>Seite</u>
3.3.3.5	pH-Optimum der ADH-Aktivität 29
3.3.3.6	Substratspezifität der ADH 31
3.3.3.6.1	Alkohole und Aldehyde als Substrate 31
3.3.3.6.2	Steroide als Substrate 36
3.3.3.7	Vergleich der scheinbaren Michaeliskon- stanten und maximalen Reaktionsgeschwin- digkeiten 37
3.3.3.8	Coenzymspezifität der Chironomus-ADH 41
3.3.3.9	Inhibition der ADH 43
3.3.3.9.1	Inhibition durch Metallkomplexbildner 43
3.3.3.9.2	Inhibition durch Merkaptidbildung und Alkylierung 46
3.3.3.9.3	Inhibition durch Strukturanaloga der Sub- strate 46
3.3.3.10	Allgemeine Kinetik der ADH 51
3.3.3.11	Reaktionsmechanismus der ADH 63
4.	Schlußbetrachtung 77
5.	Zusammenfassung 79

Literaturverzeichnis

Abkürzungen

1. Reagenzien:

ADH	-Alkoholdehydrogenase
AS	-Ammoniumsulfat
β DHT	-17 β -OH-5 β -androstanon-3
NAD	-Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH ₂	-Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
NADP	-Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NADPH ₂	-Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert
PCMB	-p-Chloromercuribenzoessäure
Tris	-Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

2. Abkürzungen für die Kinetik

A	-zuerst gebundenes Substrat
a	-Konzentration des zuerst gebundenen Substrates
B	-zuletzt gebundenes Substrat
b	-Konzentration des zuletzt gebundenen Substrates
C	-Produkt des zuerst gebundenen Substrates
c	-Konzentration von C
D	-Produkt des zuletzt gebundenen Substrates
d	-Konzentration von D
E	-Enzym
e_0	-Anfangskonzentration des Enzyms
I	-Ordinatenabschnitte
I_1	-Ordinatenabschnitte der $1/v = f(1/a)$ -plots
I_2	-Ordinatenabschnitte der $1/v = f(1/b)$ -plots
K_A	} Kinetische Konstanten, Definition s. S. 53
K_{AB}	
K_B	
K_C	
K_D	
K_{CD}	

K_{Ac}	] Kinetische Konstanten der Alkoholoxydation und der Aldehydreduktion, Definition entsprechend K_A , K_B und K_{ab} , s. S. 53
$K_{Äth.}$	
K_N	
K_{NH}	
$K_{NÄth}$	
K_{NHAc}	
S	-Steigungen
S_1	-Steigungen der $1/v = f(1/a)$ -plots
S_2	-Steigungen der $1/v = f(1/b)$ -plots
s	-Substratkonzentration
V	-maximale Reaktionsgeschwindigkeit, Definition s. S. 53
v	-Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion

3. Indizes

Ac	-Acetaldehyd
Äth	-Äthanol
C	-Konstanten der Reaktionen, die durch das Produkt des zuerst gebundenen Substrates gehemmt werden
D	-Konstanten der Reaktionen, die durch das Produkt des zuletzt gebundenen Substrates gehemmt werden
h	-Hinreaktion, Alkoholoxydation
k_1 bis k_{-6}	-Geschwindigkeitskonstanten der einzelnen Reaktionsschritte
N	-Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NH	-Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
o	-Konstanten der ungehemmten Reaktion
r	-Rückreaktion, Aldehydreduktion

1. EINLEITUNG

Ende des 19. Jahrhunderts wurde festgestellt, daß Gewebeextrakte verschiedener Tiere Alkohol oxydieren können (SCHMIEDEBERG 1881). Für das Alkohol-oxydierende Enzym, nachgewiesen an Essigsäurebakterien, führten BUCHNER und GAUNT (1906) den Begriff "Alkohol-Oxydase" ein. Untersuchungen von ANDERSON (1933) ergaben, daß NAD als Coenzym an der Alkoholoxydation beteiligt ist. EULER et al. (1936) stellten dafür folgende Reaktionsgleichung auf:



1937 kristallisierten NEGELEIN und WULFF das Enzym als erste NAD-abhängige Dehydrogenase erfolgreich aus Hefe und 1948 BONNICHSEN und WASSEN aus Pferdeleber. Seitdem konnte die Alkoholdehydrogenase (Alkohol: NAD⁺ Oxidoreduktase EC 1.1.1.1; ADH) in Geweben vieler Spezies nachgewiesen, z. T. gereinigt und charakterisiert werden (vgl. Literatur S.17).

Die Untersuchungen zeigten eine große Heterogenität der ADH in verschiedenen Organismen. Die Zahl der molekularen Formen des Enzyms erwies sich als abhängig von den Spezies (MOSER et al. 1968), ihren Entwicklungsstadien (DUNN et al. 1969) und einzelnen Organen (BÜTTNER 1965, MOSER et al. 1968, vergl. Literatur S.21). LUTSDORF et al. (1969, 1970) und PIETRUSKO und THEORELL (1969) stellten an Pferdeleber-ADH fest, daß zwei verschiedene Mechanismen für diese Heterogenität verantwortlich sind:

1. Durch Kombination von zwei Untereinheiten A und B, die sich in ihrer Primärstruktur (JÖRNVALLE 1970) unterscheiden, können drei dimere Isoenzyme gebildet werden.
2. Interkonversion von verschiedenen enzymatischen Formen bei in vitro Versuchen weisen darauf hin, daß identische Untereinheiten in mehreren Konformationen vorliegen (A' oder B') und sich beliebig

aneinanderlagern können (conformer).

Versuche von HAYES und VELICK (1954), HARRIS (1964) und BUTLER et al. (1969) ergaben für Hefe-ADH eine Tetramerenstruktur. GRELL et al. (1965, 1968) nahmen aufgrund genetischer Untersuchungen an, daß die ADH von *Drosophila melanogaster* aus zwei Untereinheiten besteht und von einem Cistron mit mehreren Allelen gebildet wird. JACOBSON und PFUDERER (1970) wiesen unter Anwendung von Dissoziationsversuchen jedoch acht Untereinheiten nach, von denen, wie Untersuchungen über die Aminosäurezusammensetzung (JACOBSON et al. 1970) zeigen, jeweils 4 identisch sein können. Danach müßten mindestens zwei Gene für die Bildung der strukturell verschiedenen Untereinheiten verantwortlich sein. Eine Klärung dieser Frage scheint äußerst interessant im Hinblick auf die Frage nach der Bildung multipler molekularer Formen von Enzymen.

Physiko-chemische Untersuchungen an Pferdeleber-ADH haben ergeben, daß das Enzym zwei aktive Zentren und vier Zinkatome enthält (zusammenfassende Darstellung bei WEINER 1969). Davon sind zwei Zinkatome an der Stabilität der Proteinstruktur und die beiden anderen an der katalytischen Funktion des Enzyms beteiligt (OPPENHEIMER et al. 1967, DRUM et al. 1967, 1969, 1970). HOAGSTROM et al. (1969) konnten durch Bindung des Coenzym an Zink-freie, katalytisch inaktive Pferdeleber-ADH nachweisen, daß Zink an der Coenzym-Enzym-Bindung nicht mitwirkt. Die Bedeutung des Zink sowohl für die Struktur als auch für die Katalyse der ADH bedarf weiterer Klärung.

HARRIS (1964), LI und VALLEE (1965) und EVANS et al. (1968) stellten fest, daß von den insgesamt 24 vorhandenen Sulphydryl-Gruppen der Pferdeleber-ADH zwei für die Enzymaktivität essentiell sind, je eine pro aktives Zentrum. Aufgrund weiterer Untersuchungen (REYNOLDS et al. 1970, REYNOLDS und McKINLEY-McKEE 1970) muß eine zentrale Rolle der SH-Gruppen bei der Coenzym-Enzym-Bindung ausgeschlossen werden. Der genaue molekulare Ablauf des katalytischen Prozesses ist noch nicht bekannt.

Über die physiologische Bedeutung der ADH war man sich lange Zeit im Unklaren. Es wurde angenommen, daß die normalen Substrate des Enzyms weder Alkohole noch Aldehyde sind, sondern spezielle Substanzen wie Vitamin A₂ (ZACHMAN und OLSON 1961), Farnesol (ein Zwischenprodukt in der Cholesterin-Synthese) oder Hydroxy- und Keto-steroiden (WALLER et al. 1965). Dagegen spricht jedoch die hohe Stereospezifität des Enzyms für Steroide. Es reagiert nur mit der 3 β -Hydroxy-Gruppe von Steroiden und den entsprechenden Ketonen, Verbindungen, die sehr selten in tierischen Geweben vorkommen (REYNIER et al. 1969, KREBS und PERKINS 1970). Diese Autoren wiesen an Ratten nach, daß Äthanol im Intestinaltrakt gebildet und absorbiert, durch die Portalvene der Leber zugeführt und dort abgebaut wird. Vergleichende Versuche an keimfreien und mit Antibiotika behandelten Ratten deuten darauf hin, daß der im Körper gebildete Alkohol größtenteils bakteriellen Ursprungs ist.

Die vorliegende Arbeit versteht sich als Beitrag zur vergleichenden Biochemie der Tiere und zur Problematik enzymatischer Reaktionsmechanismen. Sie umfaßt die Isolierung der ADH aus Larven von *Chironomus tentans*, die elektrophoretische Analyse des Enzyms, Untersuchungen zu dessen Spezifität und zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus durch kinetische Analysen und Anwendung von Inhibitoren. Die Ergebnisse werden mit denen bereits untersuchter ADH anderer Spezies verglichen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Tiermaterial

Als Versuchsobjekt diente die Larve der Zuckmücke *Chironomus tentans*. Die Larven stammen aus dem Rheinmündungsgebiet und wurden aus dem Zoohandel bezogen.

2.2 Präparation

Die Tiere wurden nach schnellem Abspülen mit Aqua dest. mit Filterpapier getrocknet, mit der fünffachen Menge eiskalten $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffers, pH 7.0, versetzt und unter Eiskühlung ca. 5 min mit einem Multimix (Fa. Braun, Nürnberg) homogenisiert. Anschließend wurden die Homogenate 1 h bei 4°C und 25 000 g zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Verwendung dekantiert.

2.3 Reagenzien

Die verwendeten Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Fa. Boehringer, Mannheim: NAD, NADH_2 , NADP, NADPH_2

Fa. Merck, Darmstadt: Methanol, Äthanol, Propanol-1, Propanol-2,

Butanol-1, Butanol-2, Butanol-3, Hexanol-1, Hexanol-2, Hexanol-3,

Formaldehyd, Acetaldehyd, Propionaldehyd, Butyraldehyd, Benzaldehyd,

Acrolein, o-Phenanthrolin, α,α -Bipyridin, Jodessigsäure, Acet-

amid, Buttersäure, Essigsäure, Semicarbazidhydrochlorid, Glutathion-

hydrochlorid, 5 β -Dihydrotestosteron, Ätiocholanol-(3 β)-on-(17), Folin-Ciocalteu-Reagenz

Fa. Fluka, Basel: 1,6Hexandiol, Cyclohexanol, Glykolaldehyd, D,L-

Glycerinaldehyd, Oktanol, Butyramid, p-Chloromercuribenzoessäure,

Fluoroäthanol, Hexanol-3

Fa. Serva, Heidelberg: Phenanzin-Methosulfat, p-Nitro-blautetrazoliumchlorid, Polyacrylamid, DEAE-SH-Cellulose

Fa. Roth, München: Methylglyoxal

Fa. Behring, Marburg: Rinder-Serumalbumin

Fa. Biocal, München: Biogel P-300

2.4 Bestimmung der ADH-Aktivität

Die Bestimmung der Aktivität der Alkohol-Dehydrogenase erfolgte nach der von WARBURG und CHRISTIAN (1936) angegebenen Methode des optischen Tests. Im Eppendorf-Photometer (Fa. Netheler und Hinz, Hamburg) wurde bei einer Wellenlänge von 366 nm der Reaktionsverlauf als Extinktionsänderung ΔE gemessen und von einem Phillips-Kompensationsschreiber mit Linearisierungseinheit (Fa. Netheler und Hinz, Hamburg) aufgezeichnet. Die Messung erfolgte mittels eines temperierbaren Küvettenhalters bei 25°C. Der Testansatz (Gesamtvolumen 3 ml) zur Bestimmung der ADH-Aktivität mit Hilfe der Acetaldehydbildung enthielt in Anlehnung an BONNICHSEN (in BERGMAYER, 1962) folgende Endkonzentration: 0,3 mM NAD, 35 mM Äthanol, 20 mM Natriumpyrophosphat/Glycerin-Puffer, pH 8,5 und 10-50 μ l Enzympräparation. Der Testansatz der Gegenreaktion, der Alkoholbildung (Gesamtvolumen 3 ml), enthielt folgende Endkonzentrationen: 0,3 mM NADH₂, 15 mM Acetaldehyd, 25 mM KH₂PO₄/Na₂HPO₄-Puffer, pH 7,0 und 10-50 μ l Enzympräparation.

Die ADH-Aktivität an Polyacrylamid-Gel wurde in Anlehnung an URSPRUNG und LEONE (1965) durch eine spezifische Farbreaktion wie folgt nachgewiesen: 0,3 mM NAD, 35 mM Äthanol, 0.02 M Natriumpyrophosphat/Glycerin-Puffer, pH 8.5, 6 mM Nitroblautetrazoliumchlorid, 6.5 mM Phenazinmethosulfat. Bei Zimmertemperatur betrug die Inkubationszeit 30 min.

2.5 Bestimmung der ADH-Aktivität mit Steroiden

Die verwendeten Steroide sind unlöslich in Wasser. Steroidlösungen wurden in Anlehnung an das Verfahren, das REYNIER (1969) für Retinol ausarbeitete, hergestellt. 3 mg 5 β -Dihydrotestosteron bzw. Ätiocholanol-(3 β)-on-(17) wurden in 10 ml Chloroform gelöst. 5 ml dieser Lösung wurden mit 10 ml einer 50% Tween 80/Chloroform-Lö-

sung gemischt. Aus dieser Mischung wurde bei 60°C unter Vakuum im Rotavapor (Fa. Büchi, Flävil, Schweiz) Chloroform abgedampft. Der Rückstand wurde in 0,025 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 7.0, aufgenommen. Für die kinetischen Messungen wurde eine Lösung verwendet, die 0,25 mM Steroid und 5% Tween 80 enthielt. Kontrollversuche mit Acetaldehyd als Substrat zeigten, daß Tween 80 in dieser Konzentration nicht hemmend wirkt.

2.6 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Proteinbestimmung wurde nach LOWRY et al. (1951) mit dem Reagenz nach FOLIN-CIOCALTEU durchgeführt. Die der bei 750 nm gemessenen Extinktion entsprechende Proteinmenge wurde aus einer für kristallines Rinderserumalbumin aufgestellten Eichkurve entnommen.

Die elektrophoretisch auf Polyacrylamid-Gel erzeugten Proteinbanden wurden nach der Methode von WIEME und RABEY (1957) mit Amidoschwarz 10 B qualitativ nachgewiesen.

2.7 Ammoniumsulfatfällung

Vorversuche ergaben, daß bei Proteinkonzentrationen von 1,5 - 2 mg/ml im Bereich von 50-70% Ammoniumsulfatsättigung die beste Reinigung bei guter Ausbeute erzielt wurde. Das Ammoniumsulfat wurde in fester Form unter ständigem Rühren zugegeben, der pH-Wert wurde mit Hilfe von 1 n Natronlauge konstant gehalten. Alle Versuche zur Isolierung des Enzyms wurden bei 4°C durchgeführt. Der zwischen 50 und 70% Ammoniumsulfatsättigung ausfallende Niederschlag wurde bei 25 000 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen. Das die ADH-Aktivität enthaltende Sediment wurde tiefgefroren und konnte in diesem Zustand ein Jahr ohne Aktivitätsverlust bei -23°C aufbewahrt werden.

2.8 Ionenaustauscher-Chromatographie

DEAE-SH-Cellulose wurde in 0,05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 7,0, äquibriert. In diesem Puffer wurde auch das zu untersuchende Material aufgetragen, das zuvor durch Dialyse gegen 0,005 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 7,0, solange entsalzt wurde, bis die Leitfähigkeit des Untersuchungsmaterials mit der Leitfähigkeit des Auftrags- und Äquibrierungs-Puffers übereinstimmte. Es wurden 2-3 mg Protein pro Gramm trockene Cellulose als 0,2 % Lösung auf die Säule gegeben. Bei Vorversuchen stellte sich heraus, daß bei einer 2-Stufen-Elution von 0,05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 7,0, und 0,4M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 7,0, die beste Reinigung und Ausbeute erzielt wurde. Die Durchflußgeschwindigkeit des Puffers durch die gepackte Säule 2 x 15 cm, betrug ca. 15 ml/h. Das Eluat wurde mit Hilfe eines LKB Univord II mit angeschlossenem Schreiber bei 254 nm auf seine Lichtdurchlässigkeit kontrolliert und mittels eines LKB Ultrorac automatisch fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihren Gehalt an ADH überprüft. Sowohl die Ionenaustauscher-Chromatographie als auch die Gel-Filtration wurden in einem LKB Combi Cold Rac-Chromatographieschrank durchgeführt.

2.9 Gelfiltration

Als Trenngel wurde Biogel P-300 der Fa. Biocal, München, benutzt. Das Gel wurde nach den Angaben der Firma vorbehandelt. Die Chromatographie-Rohre, 60 x 2 cm, wurden nach der von DETERMANN (1967) angegebenen Methode gefüllt. Als Elutionspuffer wurde 0,2 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 7,0, verwendet. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 3-4 ml/h. Die Kontrolle der Lichtdurchlässigkeit, die Fraktionierung und die Bestimmung der ADH-Aktivität wurden bereits in 2.8 beschrieben.

2.10 Elektrophorese

Die diskontinuierliche Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese wurde nach MAURER (1968) durchgeführt. Es wurden 7,5% Gele in Standard-Elektrophoreseröhrchen von 8,5 cm Füllhöhe und 0,6 cm Durchmesser verwendet. Das Puffersystem Nr. 1 nach MAURER (1968) ergab die besten Trennungen. 50 µg Protein in 35% Saccharoselösung wurden durch vorsichtiges Unterschichten des Elektroden-Puffers aufgetragen. Als Markierung der Wanderungsgeschwindigkeit diente Brom-Phenol. Die Elektrophorese wurde im Kühlschrank bei konstanter Stromstärke von 1,8 mA/cm³ Gel und einer Spannung von ca. 200-220 V durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde an den Gelen mittels der Amido-Schwarz-Färbung die Proteinbanden oder mit Hilfe der spezifischen ADH-Färbung die ADH-Banden nachgewiesen.

2.11 Stabilisierung der gereinigten Präparate

Die gereinigten Enzympräparationen wurden in der Gefriertrocknungsanlage Delta I der Fa. Christ, Osterode, bei -30°C gefriergetrocknet. Die Ampullen wurden sofort nach der Trocknung unter Stickstoff luftdicht verschlossen und bei -23°C aufbewahrt.

2.12 Durchführung der Messungen

Die Coenzyme NAD und NADH₂ wurden stets in den entsprechenden Puffern gelöst, ebenso die Substrate und Inhibitoren. Die verschiedenen Coenzym-, Substrat- und Inhibitorkonzentrationen erhielt ich durch Verdünnungsreihen, wobei die entsprechenden Puffer wiederum als Lösungsmittel verwendet wurden. Coenzym-, Substrat- und Enzymlösungen wurden im Eisbad gekühlt am Arbeitsplatz aufbewahrt. Zur Stabilisierung des Enzyms gab ich stets das Coenzym vor dem Enzym in die Küvette, startete dann die Reaktion durch Zugabe des Substrates.

Die einzelnen Meßserien für die kinetischen Untersuchungen wurden jeweils in einem Arbeitsgang durchgeführt, dabei wurde der pH-Wert zu Beginn der Meßserien nach Zugabe der verschiedenen Reagenzien in der Küvette noch einmal überprüft.

Die ADH-enthaltenden Fraktionen wurden am Schluß jeder Reinigung gepoolt, um möglichst einheitliches Untersuchungsmaterial für die Messungen zu erhalten. Jeweils 200 µl wurden in Ampullen gefriergetrocknet (vergl. 2.11). Für die Messungen wurden die gefriergetrockneten Präparate in 200 µl H₂O gelöst, um die Salzkonzentration nicht zu erhöhen. Der Vorteil der kleinen Enzymproben lag darin, daß die Aktivität während der Dauer des Verbrauchs nicht abnahm. Dies wurde durch Stichproben geprüft. Um die Ergebnisse direkt miteinander vergleichen zu können, wurde die Aktivität jedes Enzympräparates unter Standardbedingungen (s. 2.4) gemessen und die Meßwerte entsprechend korrigiert. Die Messungen wurden in der Regel einmal durchgeführt, erkennbar unsinnige Meßwerte wurden sofort während der Meßserien überprüft.

Wie in 3.3.3.10 beschrieben wird, können die Werte für die kinetischen Konstanten aus zwei verschiedenen Meßserien erhalten werden. In dieser Arbeit wurden beide Meßserien unabhängig voneinander durchgeführt, d. h. jede kinetische Konstante wurde zweimal bestimmt, um so eine Kontrolle der erhaltenen Werte zu ermöglichen. Ebenso wurden bei den Produktinhibitionsversuchen die Messungen für die ungehemmte Reaktion bei jeder Meßserie erneut durchgeführt, um so die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Aktivität der ADH verschiedener Spezies

Tab. I ADH-Aktivität verschiedener Spezies¹⁾

Spezies	Spez. Aktivität (mU/mg Pro.)
<u>Gastropoda</u>	
Planorbis corneus	- ²⁾
Lymnea spec.	-
Helix pomatia	-
Niere	21
Verdauungsorgane	6
Geschlechtsorgane	5
Herz	-
Fuß	-
<u>Bivalvia</u>	
Anodonta cygnea	
Niere	-
Kieme	-
Fuß	-
Mitteldarm	3
Gonade	-
Herz	-
<u>Annelida</u>	
Tubifex spec.	-
Lumbricus spec.	-
Hirudo medicinalis	-
Haemopsis spec.	-
<u>Chelicerata</u>	
Tegenaria atrica	9

1) gemessen wurde der Acetaldehydumsatz

2) - keine nachweisbare Aktivität

Spezies	Spez. Aktivität (mU/mg Prot.)
Opilio spec.	16
Crustacea	
Orconectes limosus	-
Oniscus asellus	7
Porcellium spec.	13
Tracheata	
Lithobius spec.	10
Schizophyllum spec.	-
Insecta	
Odonata	
Libellula spec. (Larve)	16
Orthoptera	
Carausius morosus (Adult)	7
Gryllus bimaculatus (Larve)	139
Periplaneta americana	91
Kaloterms flavicollis	
Arbeiter	39
Soldaten	16
Nymphen	89
Coptotermes niger	
Arbeiter	-
Soldaten	-
Coptotermes amanii	
Arbeiter	-
Soldaten	-
Nasutitermes costalis	
Arbeiter	11
Soldaten	-
Nasutitermes arborum	
Arbeiter	-
Soldaten	-

Spezies	Spez. Aktivität (mU/mg Prot.)
<i>Microcerotermes crassus</i>	
Arbeiter	57
Soldaten	9
<i>Heterotermes spec.</i>	
Arbeiter	-
<i>Zootermopsis spec.</i>	
Arbeiter	1
Hemiptera	
<i>Corixa spec.</i>	6
<i>Naucoris spec.</i>	6
<i>Geocoris spec.</i>	7
Hymenoptera	
<i>Apis mellifica</i>	3
<i>Bombus spec.</i>	9
Coleoptera	
<i>Hylotrupes bajulus</i> (Larve)	-
<i>Melasoma aenea</i> (Adult)	6
<i>Tenebrio molitor</i> (Larve)	30
Neuroptera	
<i>Sialis spec.</i> (Larve)	6
<i>Chrysopa spec.</i> (Adult)	23
Diptera	
<i>Tipula spec.</i> (Larve)	-
<i>Phryne zincta</i> (Adult)	115
(Larve)	35
(Puppe)	65
<i>Chironomus tentans</i> (Larve)	980

Tab. I gibt die unter den in 2.4 angegebenen Standardbedingungen gemessenen ADH-Aktivitäten verschiedener Spezies wieder. Es ist aus Tab. I zu ersehen, daß große Aktivitätsunterschiede zwischen den einzelnen Individualstadien (s. *Phryne zincta*), Individualtypen (s. Termiten) und den einzelnen Organen (s. *Helix pomatia*) bestehen.

Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Messungen nicht unter optimalen Bedingungen für die einzelnen Spezies durchgeführt wurden. Ferner ist aus Tab. 1 zu ersehen, daß die ADH vermutlich nicht dem Grundstoffwechsel dient, sondern spezifische Aufgaben zu erfüllen hat. Diese könnten in der Entgiftung exogener Alkohole bestehen, die aus der Umgebung oder mit der Nahrung aufgenommen werden oder als Stoffwechselprodukt möglicherweise vorhandener Symbionten entstehen könnten. Diese Vermutungen werden durch Untersuchungen von KREBS und PERKINS (1970) unterstützt. Diese Autoren stellten fest, daß die Alkoholkonzentration im Intestinaltrakt und im Blut bei keimfreien und mit Antibiotika behandelten Ratten abnahm, jedoch noch Alkohol nachzuweisen war. Da bei einzelnen Vertretern aller untersuchten Tierstämme (Ausnahme: Annelida) ADH-Aktivität nachzuweisen war, ist anzunehmen, daß bei allen Spezies die Strukturen für die ADH vorhanden ist, das Enzym jedoch nur bei Bedarf gebildet oder aktiviert wird. Dieses entspräche auch der speziellen Funktion des Enzyms. Zur Klärung dieser Fragen wären detailliertere Untersuchungen erforderlich.

3.2 Isolierung der ADH aus Larven von *Chironomus tentans*

Die als Versuchsobjekt verwendeten Larven der Zuckmücke *Chironomus tentans* wurden aus dem Zoohandel bezogen. Um die Einheitlichkeit des Untersuchungsmaterials zu prüfen, waren einzelnen Mückenlarven elektrophoretisch zu analysieren. Die Elektropherogramme zeigten nach ADH-spezifischer Färbung jeweils eine Bande gleicher Wanderungsgeschwindigkeit. Unter dieser Voraussetzung konnten diese Mückenlarven zur Isolierung und Charakterisierung der ADH verwendet werden.

Trennungsgang:

	Rohhomogenat in 0,025 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer pH 7,0, Zentrifugation bei 25 000 g	Sediment verworfen
Überstand:	Fällung bei 50% AS-Sättigung, Zentrifugation bei 25 000 g	Sediment verworfen
Überstand:	Fällung bei 70%-AS-Sättigung, Zentrifugation bei 25 000 g	Überstand ver- worfen
Sediment:	Dialyse gegen 0,005 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 7,0, Zentrifugation bei 25 000 g	Sediment ver- worfen
Überstand:	Ionenaustauscher-Chromatographie auf DEAE-Cellulose	Fractionen ohne ADH verworfen
ADH-enhalten- de Fractionen	Gelfiltration auf Biogel P-300	Fractionen ohne ADH verworfen
ADH-enhalten- de Fractionen	Gefriertrocknung	

Tab. 1: Isolierung der ADH aus Larven von *Chironomus tentans*

Reinigungsstufe	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität ¹⁾ (U)	Spezifische Aktivität (U/mg Prot.)	Ausbeute %
Rohhomogenat	565	97	0,17	100
25 000 g Überstand	412	93	0,23	96
AS-Fällung 50-70%	223	80	0,36	83
DEAE-Cellulose	18,7	53,5	2,86	53
Biogel P-300	0,08	1,3	16,2	1,3

¹⁾ Wenn nicht anders angegeben, stets Bestimmung der Äthanoloxydation

Dieser Trennungsgang wurde dreimal durchgeführt und erwies sich als reproduzierbar. Die Ergebnisse eines Trennungsganges sind in Tab. 1 dargestellt. Durch Ammoniumsulfatfraktionierung erreichte man eine etwa zweifache Reinigung. Bei der anschließenden Chromatographie auf DEAE-Cellulose wurde die ADH in 0,05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 7,0, zunächst an die Cellulose absorbiert und mit 0,2 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 7,0, eluiert (Abb. 1). Dies ergab eine etwa achtfache Reinigung. Die weitere Isolierung erfolgte durch Gelfiltration aus Biogel P-300 (Abb. 2). Die Durchflußgeschwindigkeit des Elutionspuffers durch die Säule betrug 3-4 ml/h. Die davon abhängige Versuchsdauer (ca. 35 h) verursachte einen Aktivitätsverlust von 15% (Abb. 3). Dennoch konnte eine etwa sechsfache Reinigung erzielt werden. Anschließend wurde das Präparat in 200 µl-Fractionen gefriergetrocknet. Die so behandelten unter Stickstoffzufuhr luftdicht abgeschlossenen Präparate zeigten während eines Jahres keinen Aktivitätsverlust.

Die spezifische Aktivität der bei dieser Reinigung erhaltenen Enzymproben ist in Tab. 2 mit der spezifischen Aktivität anderer gereinigter ADH zum Vergleich aufgeführt (s. S. 17).

Zur elektrophoretischen Analyse wurden 50 µg des gereinigten Präparats auf Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die ADH-spezifische Anfärbung ergab eine ADH-Bande (vgl. 3.3.1) die Anfärbung mit Amido-Schwarz jedoch vier Proteinbanden außer der der ADH. Versuche, das Enzym aus den aus den Gelen herausgeschnittenen ADH-enthaltenden Blöcken zu eluieren, blieben ohne Erfolg. Mit Hilfe einer präparativen Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese, bei der das Trägermaterial durch mehrfaches Umkristallisieren von möglichen Verunreinigungen befreit wurde, konnte keine besseren Ergebnisse erzielt werden.

Aufgrund der Gelfiltration mit Biogel P-300 läßt sich das Molekulargewicht der Chironomus-ADH auf ca. 130 000 - 160 000 abschätzen. Dieses Ergebnis ist nicht grundsätzlich verschieden von denen der bereits bekannten ADH. Für Säugetier-ADH wird das Molekulargewicht um 85.000 (EHRENBERG

und DALZIEL, 1958; PAPENBERG et al. 1965; von WARTBURG et al. 1964), für *Drosophila*-ADH 44 000 (SOFER und URSPRUNG 1968) und für Hefe-ADH 157 000 (SUND 1963) angegeben.

Tab. 2: Zusammenstellung spezifischer Aktivitäten gereinigter ADH verschiedener Herkunft

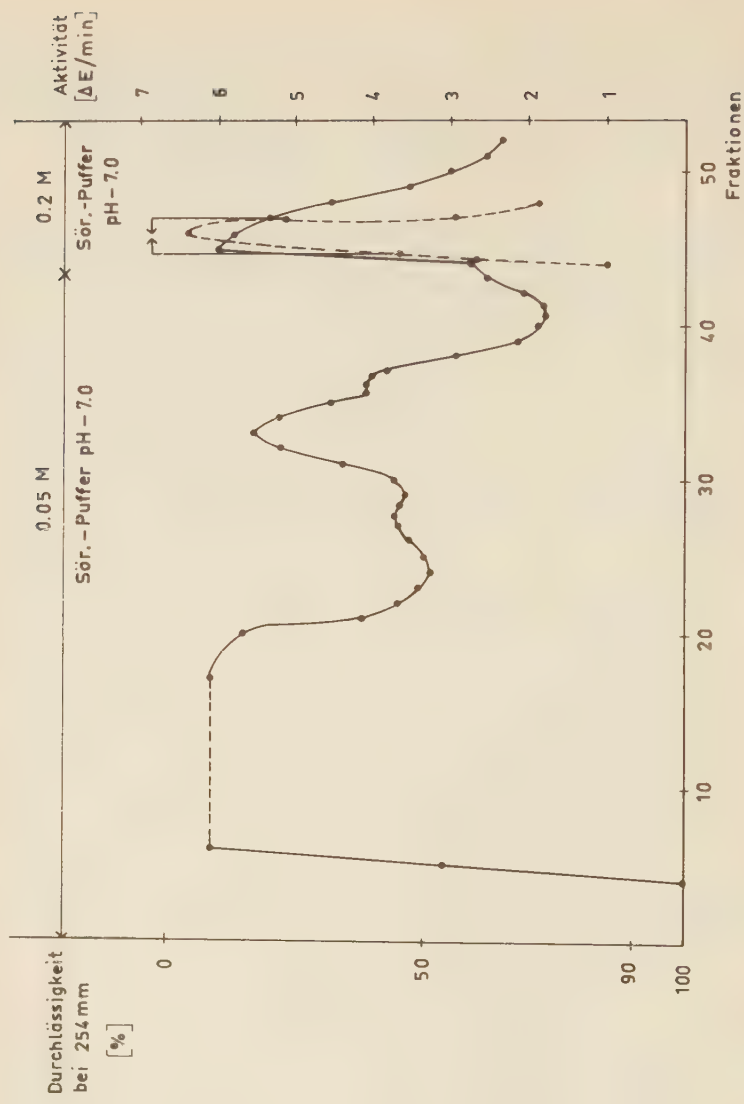
Spezies	Spez. Akt. U/mg Prot.	Literatur
Mensch ^{+) I} ⁺⁺⁾	0,53	1
Rhesusaffe I	0,34	2
Ratte	1,73	3
Pferd III	4,66	4
<i>Drosophila</i>	45	5
<i>Chironomus</i>	16	6
Hefe	63	7

^{+) Bei Wirbeltieren stets die ADH der Leber}

^{++) Isoenzyme mit der höchsten spezifischen Aktivität}

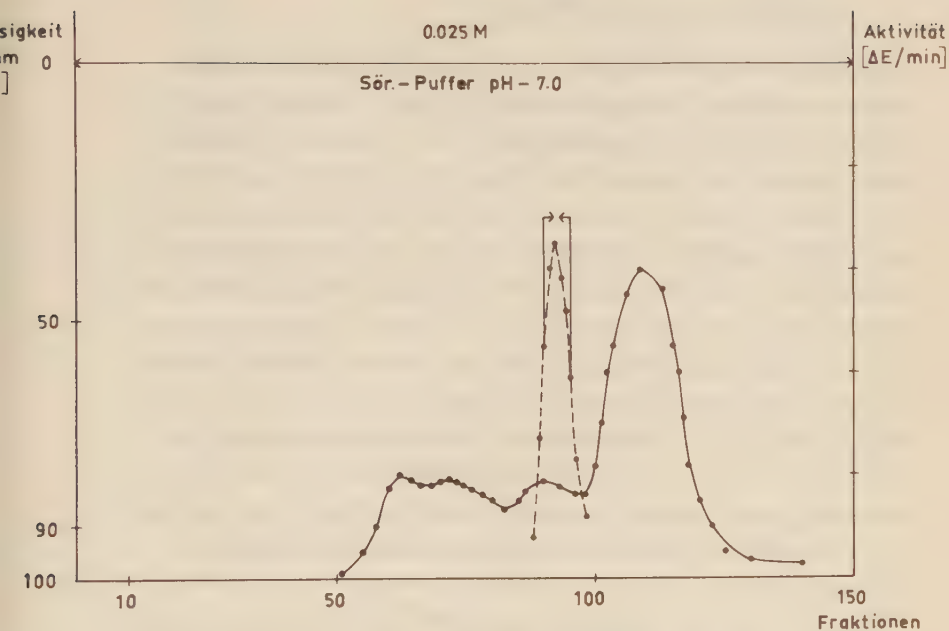
- Literatur:
1. BLAIR und VALLEE (1966)
 2. PAPENBERG et al. (1965)
 3. MARKOVIC et al. (1971)
 4. LUTSDORF et al. (1970)
 5. SOFER und URSPRUNG (1968)
 6. diese Arbeit
 7. EBIZUZAKI und BARRON (1957)

Abb. 1 Elutionsdiagramm für DEAE-Cellulose



— Durchlässigkeit des Eluats bei 254 nm
 ---- ADH-Aktivität (Aldehydreduktion)
 (Test s. 2.4)

Abb. 2 Elutionsdiagramm für Biogel P-300



———— Durchlässigkeit des Eluats bei 254 nm

----- ADH-Aktivität (Aldehydreduktion)

(Test s. 2.4)

3.3 Charakterisierung der gereinigten ADH aus Larven von Chironomus tentans

3.3.1 Zum Vorkommen von Isoenzymen

Eine elektrophoretische Analyse mit Polyacrylamid-Gel als Trägermaterial ergab nach ADH-spezifischer Färbung eine Bande. Das Auftreten von Artefakten ist auszuschließen, da die Bande in Substratfreiem Medium nicht auftrat. Elektrophoretische Auftrennungen des Rohhomogenats wiesen ebenfalls nur eine Bande vergleichbarer Wanderungsgeschwindigkeit auf. Daraus ergibt sich, daß keine eventuell vorhandenen ADH-Isoenzyme während der Reinigung verloren gegangen sind. Bereits untersuchte ADH anderer Spezies zeigen eine unterschiedliche Anzahl von Isoenzymen. Selbst bei gleichen Spezies finden sich in der Literatur voneinander abweichende Angaben über die Anzahl ihrer Isoenzyme (Tab. 3). Auch andere Enzyme verschiedener Spezies z. B. Lactat-Dehydrogenase, Aldolase, Hexokinase etc. verhalten sich entsprechend. In der Literatur werden folgende Ursachen für das Auftreten von Isoenzymen angegeben (zusammenfassende Darstellung bei KAPLAN, 1968):

1. Genetisch bedingtes Vorkommen multipler molekularer Formen von Enzymen verursacht durch:
 - a. verschiedene Gene
 - b. verschiedene Allele eines Gens
2. Chemisch bedingtes Vorkommen multipler molekularer Formen von Enzymen verursacht durch:
 - a. Aggregat-Bildung
 - b. "Conformer" (s. S. 1)
 - c. Artefakte

Aufgrund der vorliegenden Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß die ADH der Larve von Chironomus tentans unter diesen Bedingungen keine Isoenzyme aufweist.

Tab. 3 Anzahl der Isoenzyme der ADH verschiedener Spezies

Spezies	Anzahl der Isoenzyme	Literatur
Mensch	3	1
Rhesusaffe	2	2
Ratte	4	3
Pferd	12	4
	9	5
Drosophila	5	6
	7	7
Chironomus	1	8
Hefe	4	9

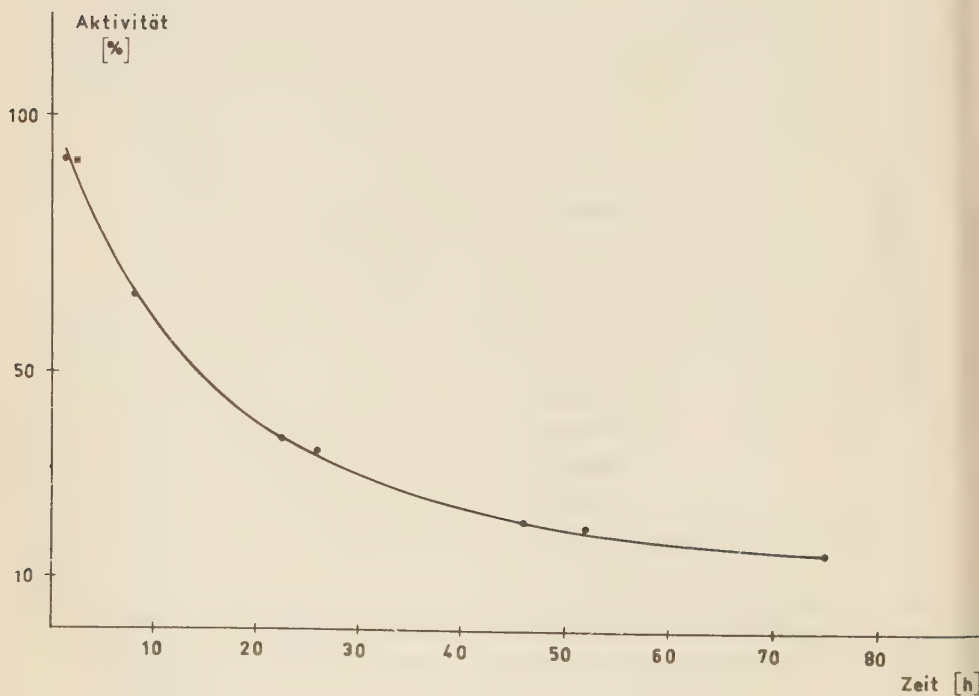
- Literatur:
1. BLAIR und VALLEE (1966)
 2. PAPENBERG et al. (1965)
 3. MARKOVIC et al. (1971)
 4. LUTSDORF et al. (1970)
 5. PIETRUSKO et al. (1969)
 6. JACOBSON et al. (1970)
 7. URSPRUNG und CARLIN (1968)
 8. diese Arbeit
 9. LUTSDORF und MEGNET (1968)

3. 3. 2 Stabilität der ADH

Frisch angesetzte Homogenate verloren bereits nach 15-stündiger Aufbewahrung in 0,025 M Sör.-Puffer, pH 7,0, bei 4°C 50% ihrer Aktivität (Abb. 3). Wenn die Extrakte gefriergetrocknet wurden, büßte man dadurch 20% der Aktivität ein. Die wieder in Lösung gebrachten gefriergetrockneten Extrakte zeigten jedoch unter gleichen Bedingungen erst nach 120 h einen Aktivitätsverlust von 50%. Veränderungen des pH-Wertes ergaben eine Erhöhung der Stabilität um 4-10% bei pH 8,5 gegenüber pH 6,0 (Abb. 4). Verdünnte Enzymlösung (0,1%)

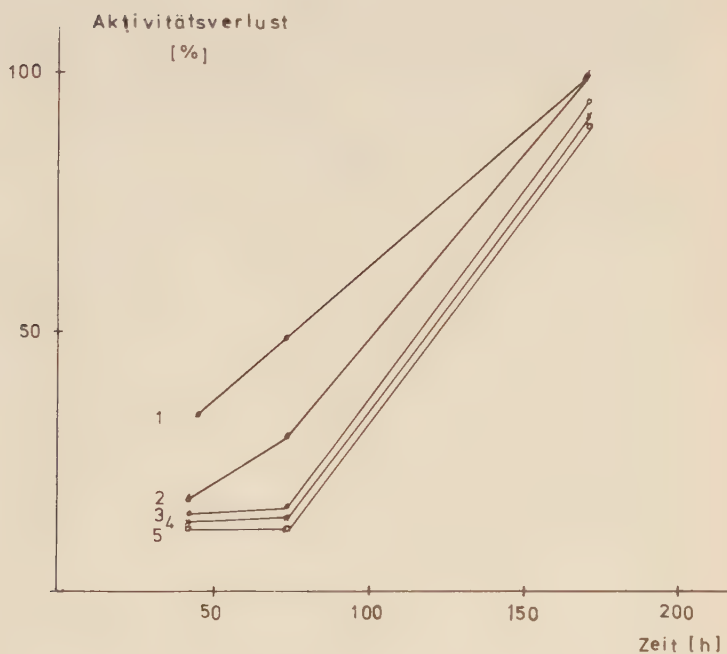
konnte durch Zugabe von Coenzym (1 mM Endkonzentration) stabilisiert werden. Bei Substratzugaben erhielt man keine entsprechende Wirkung.

Abb. 3 Abnahme der ADH-Aktivität mit der Zeit



(Test s. 2.4, Aldehydreduktion)

Abb. 4: Abnahme der ADH-Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit und dem pH-Wert des Aufbewahrungspuffers



ADH-Aktivität bei

- | | |
|-------------|-------------|
| 1. pH = 5,0 | 4. pH = 8,0 |
| 2. pH = 6,0 | 5. pH = 8,5 |
| 3. pH = 7,0 | |

Aufbewahrung des Untersuchungsmaterials in $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer. (Test: s. 2.4, Aldehydreduktion)

MARKOVIC et al. (1971) stellten eine höhere Stabilität der ADH von Rattenleber im basischen Bereich fest - übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit -, darüber hinaus einen stabilisierenden Effekt von Äthanol. Wenn die Sedimente der 50-70% Ammoniumsulfatfällung tiefgefroren wurden, traten durch diesen Vorgang keine Aktivitätsverluste auf. Deshalb wurde das Untersuchungsmaterial bis zur Ammoniumsulfatfällung aufbereitet und bis zur weiteren Verwendung als tiefgefrorene AS-Fällung aufbewahrt.

3.3.3 Reaktionskinetik

3.3.3.1 Enzymaktivität und -konzentration sind innerhalb des meßbaren Bereichs einander proportional (vergl. Abb. 5).

3.3.3.2 Puffersystem

Bei einem Vergleich von Chironomus-ADH-Aktivitäten in verschiedenen Puffersystemen bei gleicher Molarität und gleichem pH-Wert kommt man zu folgendem Ergebnis:

Tab. 4: Vergleich von ADH-Aktivitäten der Larven von *Chironomus tentans* in verschiedenen Puffersystemen

Puffersystem	rel. Aktivität
<u>Aldehydreduktion</u>	
$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$	100
$\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$	100
$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Citronensäure}$	105
$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7/\text{HCl}$	82
<u>Alkoholoxydation</u>	
Tris/HCl	87
$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7/\text{Glycin}$	100
Johnson-Lindsay-Universal-Puffer	67

Die Verminderung der Aktivität in den HCl-haltigen Puffern könnte auf die Cl^- -Ionen zurückzuführen sein. THEORELL (1955) stellte in seinen Untersuchungen über den Einfluß von Anionen auf das ADH-System der Pferdeleber fest, daß Chlorid-Ionen den Coenzym-Enzym-Komplex stabilisieren und die Reaktion dieses Komplexes mit Alkohol hemmen. Für den Aktivitätsverlust der Chironomus-ADH im Johnson-Lindsay-Universal-Puffer scheinen entweder die Borat-Ionen oder die Diäthylbarbitur-

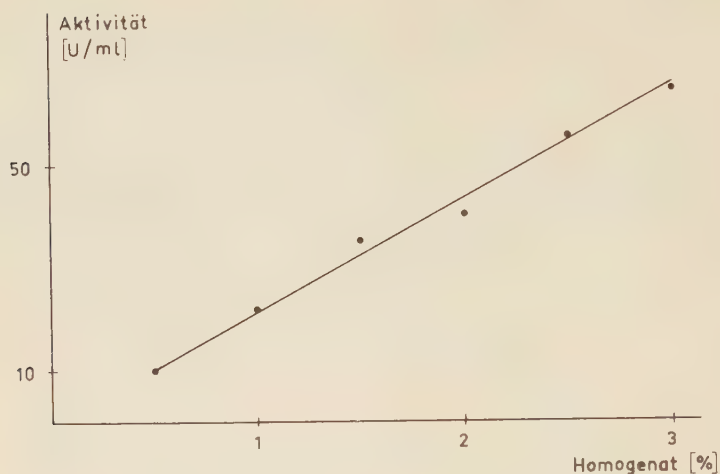
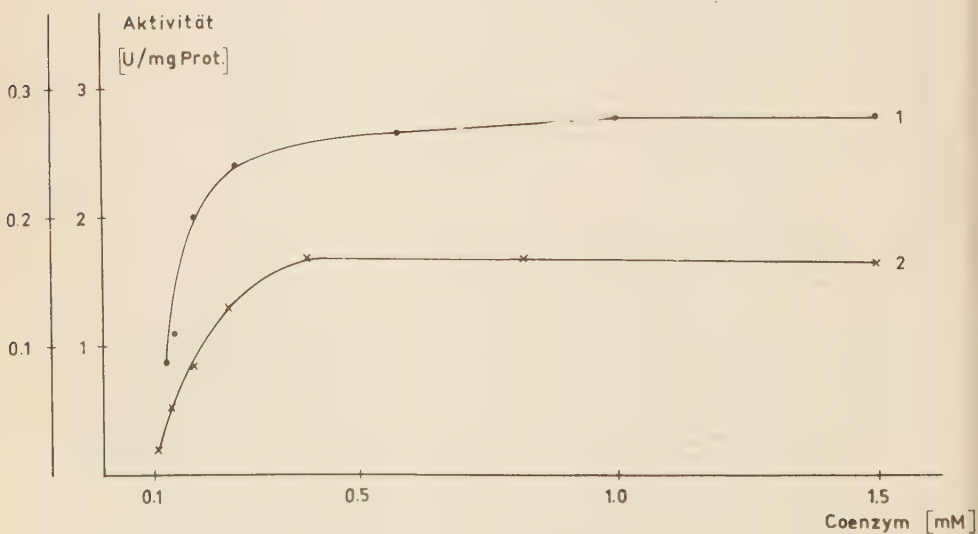


Abb. 6: ADH-Aktivität in Abhängigkeit von der Coenzymkonzentration



1. ● —●— NADH₂-Konzentration

2. x —x— NAD-Konzentration

(Test für Abb. 5 und 6: s. 2.4)

säure verantwortlich zu sein. Daraus ist zu entnehmen, daß für die Bestimmung der Aldehydreaktion der $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer bzw. der Natriumphosphat-Puffer und für die der Alkoholoxydation der $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ /Glycin-Puffer zu befriedigenden Ergebnissen führen.

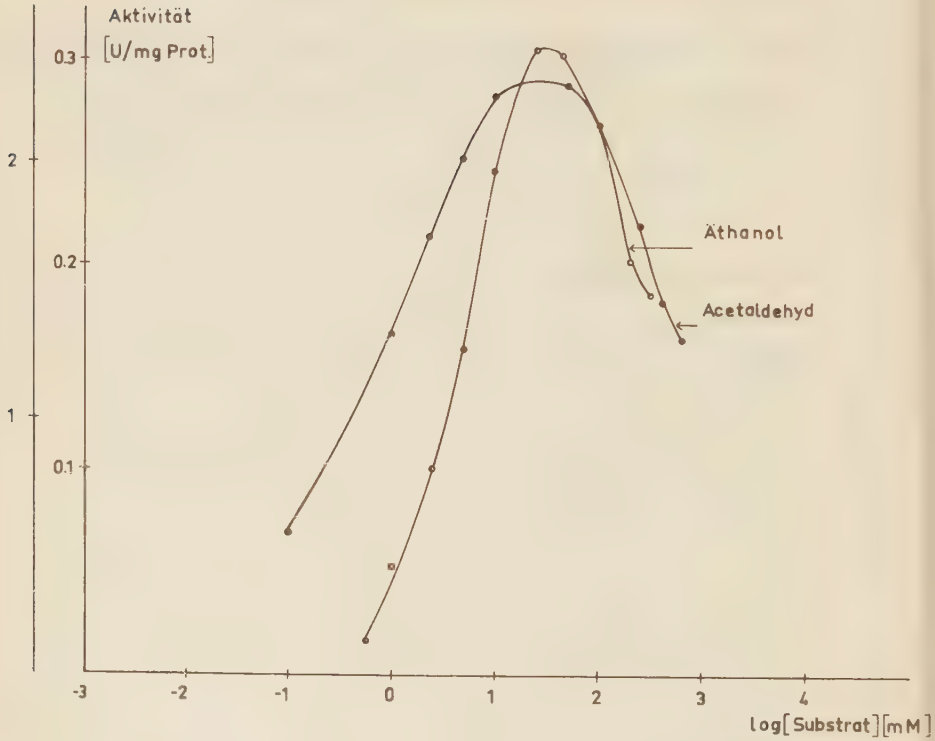
3.3.3.3 Abhängigkeit der ADH-Aktivität von der Coenzymkonzentration

Die graphischen Darstellungen der oben genannten Abhängigkeit (Abb. 6) zeigen sowohl für die Alkoholoxydation als auch für die Aldehydreaktion Sättigungskurven. Die Coenzymsättigung wurde bei einer NAD- und NADH_2 -Konzentration von 0,5 mM erreicht.

3.3.3.4 Abhängigkeit der ADH-Aktivität von der Substratkonzentration

Aus Abb. 7 geht hervor, daß hohe Substratkonzentrationen die Aktivität hemmen. Eine entsprechende Beobachtung haben DALZIEL und DICKINSON (1966), SHORE und THEORELL (1966) und LUTSDORF et al. (1970) an Pferdeleber-ADH, von WARTBURG et al. (1964) an Menschenleber-ADH und PAPENBERG et al. (1965) an Rhesusaffenleber-ADH gemacht. DALZIEL und DICKINSON (1966) führen dieses Phänomen auf die Bildung eines abortiven Enzym- NADH_2 -Alkohol-Komplexes zurück, der bei hohen Alkoholkonzentrationen langsam in Enzym-Alkohol und NADH_2 dissoziiert. Bei der Reduktion von Aldehyden wurden ebenfalls eine Hemmung der Aktivität bei hohen Substratkonzentrationen an Chironomus-ADH (Abb. 7) sowie an Wirbeltier-ADH (PAPENBERG et al. 1965, LUTSDORF et al. 1970) festgestellt. Die Untersuchungen von DALZIEL und DICKINSON (1966) deuten darauf hin, daß bei dieser Rückreaktion die Hemmung auf einen abortiven Enzym-NAD-Aldehyd-Komplex zurückgeht, der bei hohen Aldehydkonzentrationen in Enzym-Aldehyd und NAD zerfällt. Alle untersuchten Alkohole und Aldehyde zeigen diese Substratüberschußhemmung. Das Optimum der Alkoholoxydation liegt bei 35 mM Äthanol, das der Aldehydreduktion bei 15 mM Acetaldehyd. In Tab. 5 sind die Aktivitätsoptima der ADH einiger Spezies zusammengestellt.

Abb. 7: Abhängigkeit der ADH-Aktivität von der Substratkonzentration



(Test s. 2.4, Variation der Substratkonzentrationen)

Tab. 5: Substratkonzentrationen für optimale ADH-Aktivitäten
verschiedener Spezies

Spezies	Äthanol (mM)	Acetaldehyd (mM)	Literatur
Mensch	60		1
Rhesusaffe I ⁺)	50	10	2
II	30	3	
Pferdeleber III	10		3
V	100		
Chironomus	35	25	4
+) Isoenzyme			

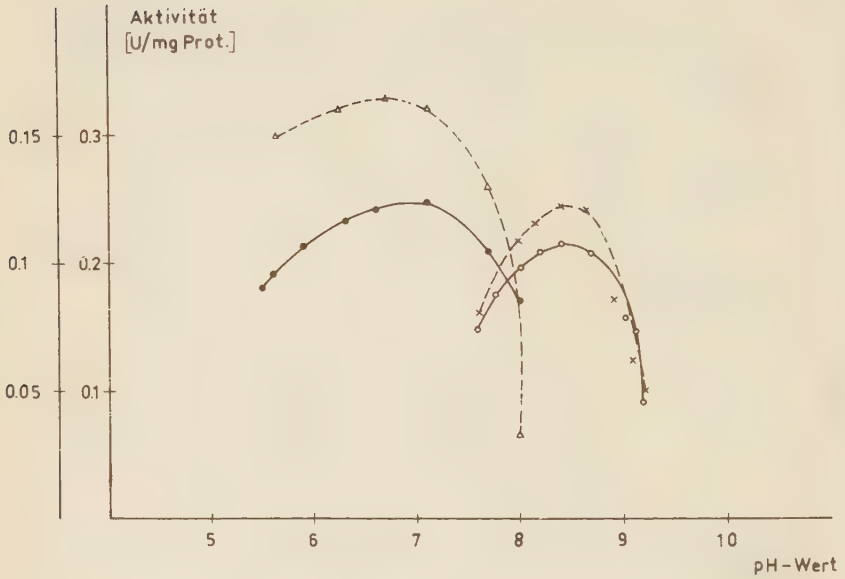
- Literatur:
1. von WARTBURG et al. (1964)
 2. PAPENBERG et al. (1965)
 3. LUTSDORF et al. (1970)
 4. diese Arbeit

Interessant ist, daß die optimalen ADH-Aktivitäten der Isoenzyme bei verschiedenen Substratkonzentrationen erreicht werden.

3.3.3.5 pH-Optimum der ADH-Aktivität

Abb. 8 zeigt die Abhängigkeit der ADH-Aktivität vom pH-Wert, sowohl für die Alkohol-, als auch für die Aldehydumsetzung. Die Substratkonzentrationen wurden so niedrig gewählt, daß eine Substratüberschußhemmung auszuschließen ist. Alle untersuchten Alkohole zeigten ein pH-Optimum im Bereich von pH 8-9, alle Aldehyde im Bereich von pH 6-7. In Tab. 6 werden die pH-Optima einiger ADH zusammengestellt.

Abb. 8: Abhängigkeit der ADH-Aktivität vom pH-Wert



1. ○—○—○ 5 mM Äthanol
2. x—x—x 5 mM Propanol
3. ○—○—○ 0,1 mM Acetaldehyd
4. △--△--△--△ 0,1 mM Propionaldehyd

(Test: s. 2.4)

Tab. 6: Zusammenstellung der pH-Optima der ADH verschiedener Spezies

Spezies		pH-Opt. der Alkohol-Oxy- dation	pH-Opt. der Aldehyd-Re- duktion	Literatur
Rhesusaffe	I	10, 15	5, 6	1
	II	10, 85	5, 6	
Pferd	III	10, 3		2
	V	10, 9		
Saccharomyces	II	9, 8		3
	IV	9, 6		
Mensch		11	6, 5	4
Chironomus		8, 5	7, 0	5

- Literatur:
1. PAPENBERG et al. (1965)
 2. LUTSDORF et al. (1970)
 3. LUTSDORF und MEGNET (1968)
 4. von WARTBURG et al. (1964)
 5. diese Arbeit

3.3.3.6 Substratspezifität der ADH

3.3.3.6.1 Aldehyde und Alkohole als Substrate

Die Umsatzgeschwindigkeit für primäre, sekundäre, tertiäre und aromatische Alkohole sowie für Aldehyde wurden unter den in 2.4 angegebenen Bedingungen gemessen. Die Substratkonzentrationen wurden im Rahmen der Löslichkeit in Wasser variiert. In Abb. 9 und 10 sind die Substratumsatzkurven dargestellt. Um bessere Vergleichsmöglichkeiten zu haben, wurden auf der Ordinate die relativen Aktivitäten eingezeichnet. Diese beziehen sich auf den Umsatz von Äthanol bei einer Konzentration von 35 mM bzw. von Acetaldehyd bei 15 mM. Alle geprüften Substrate führen zu einer Überschußhemmung. In Tab. 7 und 8 sind die relativen Aktivitäten der ADH von *Chironomus tentans* als Wirbellose im Vergleich zu denen einiger Wirbeltiere und Hefe aufgeführt.

Tab. 7.: Zusammenstellung der relativen Aktivitäten der ADH verschiedener Spezies mit verschiedenen Alkoholen

Alkohole	Saccharomyces ¹⁾		Rhesusaffe ²⁾		Pferd ³⁾	Pferd ⁴⁾	Mensch ⁵⁾	Chironomus ⁶⁾
	II	IV	I	II				
Methanol			30	10	-	-	120	-
Äthanol	100	100	100	100	100	100	100	100
Propanol-1	121	40			110	35	140	52
Propanol-2	44	6	40	75	-	-	40	-
Butanol-1	144	22	90	120	160	119	170	53
Butanol-2	17	1				35		-
Butanol-3						-		-
Hexanol-1					130	29	150	59
Hexanol-2								-
Hexanol-3								42
1,6-Hexandiol								46
Cyclohexanol			40	140		138		-
Oktanol-1			45	-		20		25

- keine nachweisbare Aktivität

Literatur:

1. LUTSDORF und MEGNET (1968)
2. PAPENBERG et al. (1965)
3. WIENER (1958)
4. MERRITT und TOMKINS (1959)
5. von WARTBURG et al. (1964)
6. diese Arbeit

Tab. 8: Zusammenstellung der relativen Aktivitäten der ADH verschiedener Spezies mit verschiedenen Aldehyden

Aldehyde	Rhesusaffe ¹⁾		Pferd ²⁾		Pferd ³⁾	Chironomus ⁴⁾
	I	II	III	V		
Formaldehyd	50	33	10	10	23	10
Acetaldehyd	100	100	100	100	100	100
Propionaldehyd	113	167	120	170	1700	74
Butyraldehyd						75
Benzaldehyd					182	40
Acrolein						30
D, L-Glycerinalde-					7	-
hydglyoxal						14
Glykollaldehyd						8

- keine nachweisbare Aktivität

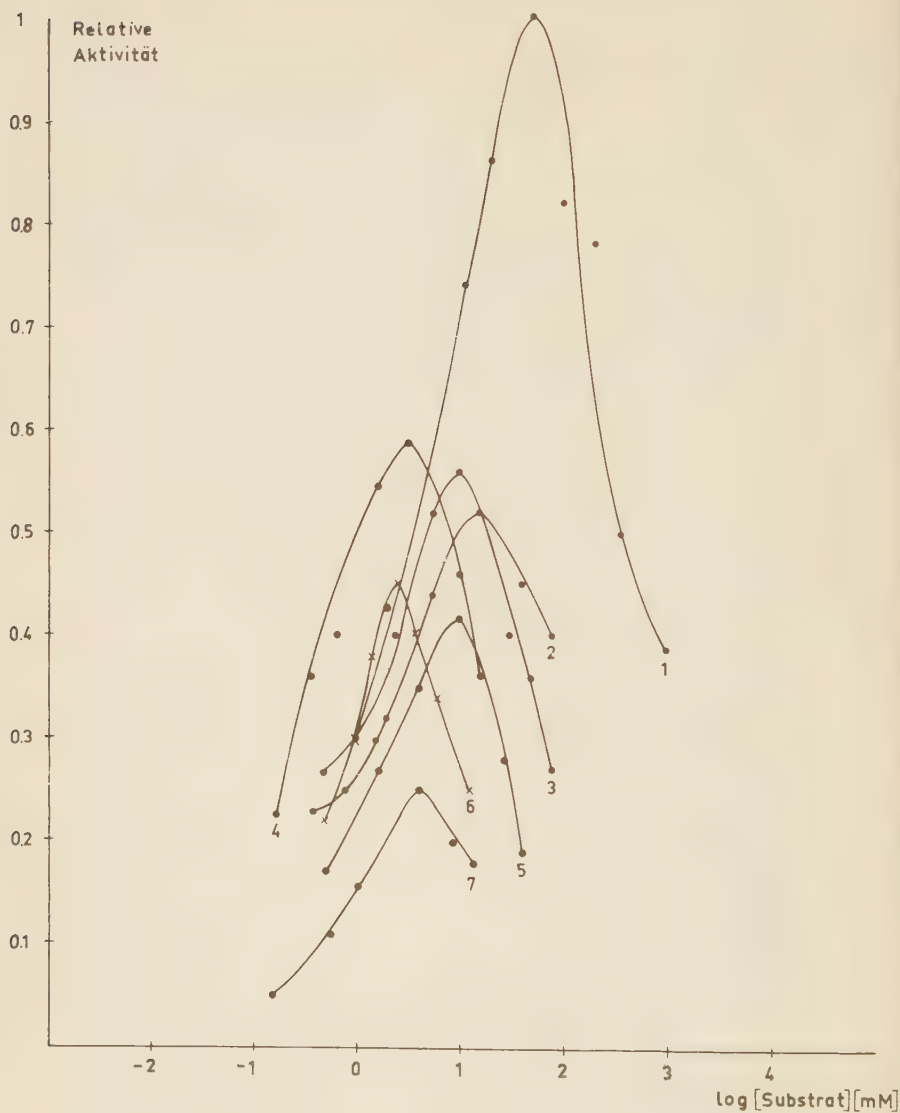
Literatur: 1. PAPENBERG et al. (1965)

2. LUTSDORF et al. (1970)

3. WINER (1958)

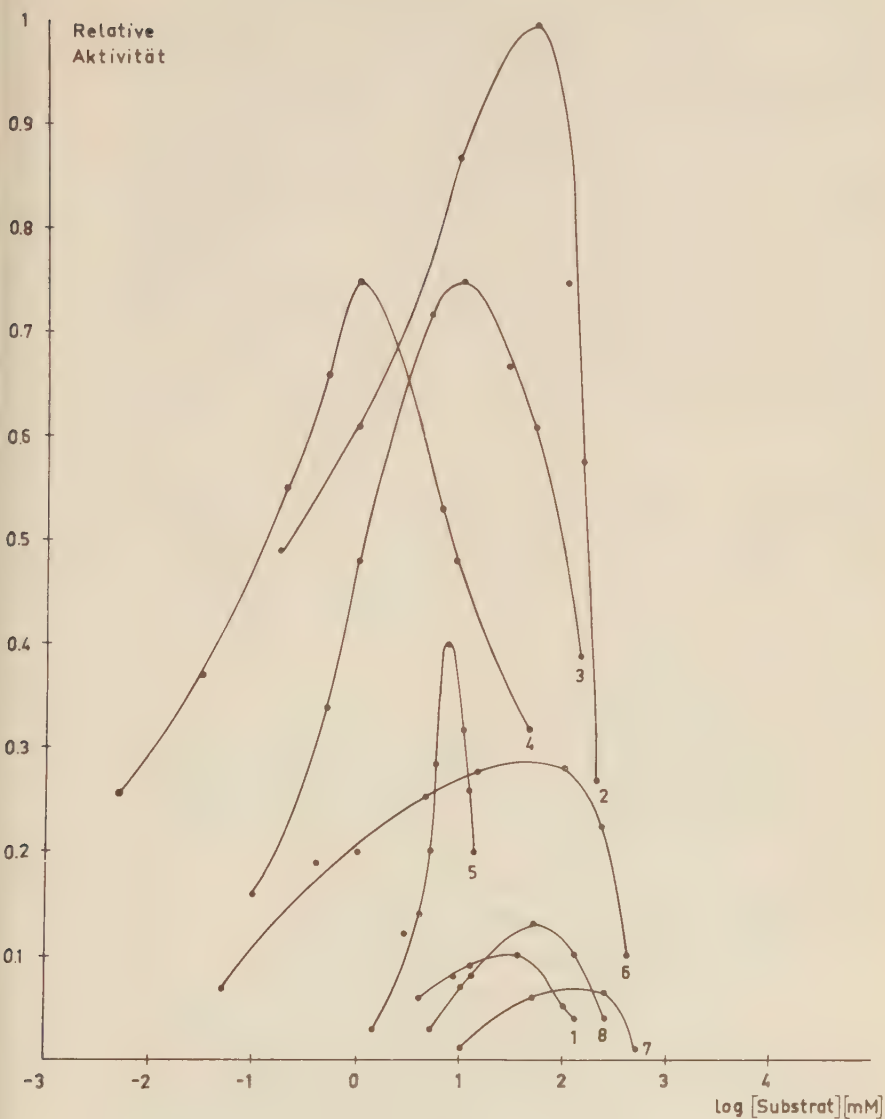
4. diese Arbeit

Abb. 9: Aktivität der ADH mit verschiedenen Alkoholen



- | | | |
|---------------|------------------|------------|
| 1. Äthanol | 4. Hexanol-1 | 7. Oktanol |
| 2. Propanol-1 | 5. Hexanol-3 | |
| 3. Butanol-1 | 6. 1,6-Hexandiol | |

Substratkonzentrationen variiert, 0,3 mM NAD, 0,02 M Natriu pyrophosphat/Glycin-Puffer, pH 8,5.



- | | | |
|-------------------|-----------------|------------------|
| 1. Formaldehyd | 4. Butyraldehyd | 7. Glykolaldehyd |
| 2. Acetaldehyd | 5. Benzaldehyd | 8. Methylglyoxal |
| 3. Propionaldehyd | 6. Acrolein | |

Substratkonzentrationen variiert, 0.3 mM NADH_2 ,
 $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, 0.025 M, pH 7.0.

Unter den jeweils gewählten Bedingungen wird Äthanol sowohl von Chironomus als auch von ADH I der Rhesusaffen am schnellsten oxidiert. Bei den anderen untersuchten ADH ist die Umsatzgeschwindigkeit bei aliphatischen gesättigten und ungesättigten Alkoholen mit 4-6 C-Atomen höher als die Äthanoloxydation. Ein Umsatz von Cyclohexanol konnte an Chironomus-ADH im Gegensatz zu den bisher untersuchten ADH nicht beobachtet werden. Ebenso wurden die geprüften sekundären Alkohole von Chironomus-ADH nicht umgesetzt. Methanol war unter den gewählten Bedingungen kein Substrat für Chironomus-ADH. Die Umsatzgeschwindigkeit von Methanol mit Menschenleber-ADH liegt dagegen in der Größenordnung des Äthanolumsatzes (MANI et al. 1970).

Die Reduktion von Aldehyden ist bisher nicht intensiv untersucht worden. Chironomus zeigt die höchste Aktivität mit Adetaldehyd, Wirbeltier-ADH eine größere mit Propionaldehyd. D,L-Glycerinaldehyd, ein im Kohlenhydratabbau vorkommendes Stoffwechselprodukt, wird von Chironomus-ADH nicht umgesetzt, kann jedoch der Pferdeleber-ADH als Substrat dienen. Aus den Untersuchungen ergibt sich, daß Chironomus-ADH eine ausgeprägtere Substratspezifität als Hefe- und Wirbeltier-ADH aufweist.

3.3.3.6.2 Steroide als Substrat

Es ist bekannt, daß Isoenzyme der Pferdeleber-ADH (LADHS, THEORELL et al. 1966) oder Isoenzym I (PIETRUSKO et al. 1966) - sowohl eine Aktivität mit den klassischen Substraten der ADH als auch mit Steroiden zeigen. PIETRUSKO (1969) stellte fest, daß dieses Isoenzym aus zwei verschiedenen Untereinheiten besteht:

1. Untereinheit E - verantwortlich für die Äthanolaktivität
2. Untereinheit S - verantwortlich für die Steroidaktivität.

Durch Dissoziations- und Rekonstitutionsversuche konnten Isoenzyme, die nur aus EE- oder SS-Untereinheiten bestehen, hergestellt werden. In diesem Zusammenhang war es interessant, die Chironomus-ADH auf Steroidaktivität zu prüfen. Tab. 9 zeigt die Ergebnisse im Vergleich mit Pferdeleber-ADH.

Tab. 9: Steroidaktivitäten der Chironomus- und Pferdeleber-ADH

Enzym	Steroid (β -DHT) (U/mg Prot.)	Literatur
Isoenzym EE ¹⁾	0,055-0,15	1
Isoenzym ES ¹⁾	1,1	
Isoenzym SS ¹⁾	2,4	
Chironomus	1,7	2

¹⁾ Durch Rekombination von Monomeren hergestellte Isoenzyme der Pferdeleber-ADH

Literatur: 1. PIETRUSKO et al. (1969)

2. diese Arbeit

MARKOVIC (1971) wies an Rattenleber-ADH ebenfalls einen β -DHT-Umsatz nach. Weitere Untersuchungen an Pferdeleber-ADH (UNGAR et al. 1960, 1965; GRAVES et al. 1965, WALLER et al. 1965, PIETRUSKO et al. 1966) ergaben eine Stereospezifität des Enzyms für 3β -Hydroxy-Steroide. REYNIER et al. (1969) zeigten, daß außerdem die Ringe A und B in cis-Stellung miteinander verknüpft sein müssen. Diese Voraussetzungen waren bei dem von Chironomus-ADH umgesetzten Substrat erfüllt. MERRITT und TOMKINS (1959). GRAVES et al. (1965) und REYNIER et al. (1969) konnten keine Reduktion der Keto-Gruppe am C¹⁷-Atom von Steroiden durch Pferdeleber-ADH nachweisen. Chironomus-ADH reduziert hingegen 3β -OH- 5β -androstanon-17 unter den in 2.5 angegebenen Bedingungen mit einer spezifischen Aktivität von 1,4 U/mg Protein. Das Enzym zeigt damit bei den Steroidsubstraten eine geringere Spezifität als bei den klassischen Substraten.

3.3.3.7 Vergleich von scheinbaren Michaeliskonstanten und maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten

Für eine weitere Charakterisierung der Chironomus-ADH wurden die Michaeliskonstanten und die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten

bestimmt. Die nach LINEWEAVER und BURK (1934) im $1/v$ gegen $1/s$ -Diagramm dargestellte Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit der Enzymreaktion von der Substratkonzentration ergab Geraden. Bei der Alkoholoxydation sind zwei Substrate beteiligt. Daraus folgt, daß der Schnittpunkt der Geraden mit der Abzisse von der Konzentration des konstant gehaltenen Substrates abhängig ist. Dieser gibt daher nicht direkt den Reziprokwert der Michaeliskonstanten wieder, sondern nur die scheinbare Affinität zum Substrat. In Tab. 10 sind die scheinbaren Michaeliskonstanten einiger ADH mit verschiedenen Substraten, gemessen bei Coenzym sättigung, aufgeführt. Die Chironomus-ADH zeigt einen abnehmenden K_m -Wert mit Alkoholen steigender Kettenlänge bis zum Hexanol-1, dieser nimmt beim C_8 -Alkohol leicht zu. Die Michaeliskonstanten der Aldehydreduktion haben eine ähnliche Tendenz (vgl. Tab. 11).

Die scheinbaren Michaeliskonstanten der Alkoholoxydation der ADH aus Menschenleber, Rhesusaffenleber, Hefe und Chironomus sind in der Größenordnung vergleichbar. Bei der Aldehydreduktion ergibt sich, daß die scheinbare K_m der Hefe um eine Zehnerpotenz kleiner als bei den anderen untersuchten ADH ist.

In Tab. 12 sind die scheinbaren Michaeliskonstanten und zum Vergleich die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten der ADH von Chironomus aufgeführt. Die größte maximale Reaktionsgeschwindigkeit wurde sowohl beim C_2 -Alkohol als auch -Aldehyd festgestellt und nimmt bei Substraten kleinerer und größerer Kettenlänge ab.

Tab. 10: Zusammenstellung der scheinbaren Michaeliskonstanten für verschiedene Alkohole, gemessen an den ADH verschiedener Spezies

Substrat	Ratte ¹⁾	Saccharomyces ²⁾ II IV (M)	Mensch ³⁾ (M)	Rhesusaffe ⁴⁾ I II (M)	Pferd ⁵⁾ (M)	Chironomus ⁶⁾ (M)
Methanol						
Äthanol	$2,1 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-3}$	$3,0 \cdot 10^{-2}$ $1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$ $3,3 \cdot 10^{-3}$	$0,7 \cdot 10^{-3}$ $2,3 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$ $9,1 \cdot 10^{-4}$
Propanol-1						
Propanol-2	$7,6 \cdot 10^{-2}$					
Butanol-1	$8,7 \cdot 10^{-3}$					
Hexanol-1					$2,2 \cdot 10^{-4}$	$5,9 \cdot 10^{-4}$ $1,7 \cdot 10^{-4}$
Hexanol-3						$7,7 \cdot 10^{-4}$
1,6-Hexandiol						$4,0 \cdot 10^{-4}$
Oktanol-1						$4,0 \cdot 10^{-4}$
Cyclohexanol	$1,1 \cdot 10^{-3}$					

- Literatur:
1. MARKOVIC et al. (1971)
 2. LUTSDORF und MEGNET (1968)
 3. BLAIR und VALLEE (1966)
 4. PAPENBERG et al. (1965)
 5. THEORELL und BONNICHSEN (1951)
 6. diese Arbeit

Tab. 11: Zusammenstellung der scheinbaren Michaeliskonstanten für verschiedene Aldehyde, gemessen an den ADH verschiedener Spezies

Substrat	Saccharomyces ¹⁾ II (M)	Mensch ²⁾ (M)	Pferd ³⁾ (M)	Rhesusaffe ⁴⁾ I (M)	II (M)	Chironomus ⁵⁾ (M)
Formaldehyd			$8,0 \cdot 10^{-3}$ ⁶⁾			$3,7 \cdot 10^{-3}$
Acetaldehyd	$3,8 \cdot 10^{-5}$	$2,2 \cdot 10^{-5}$	$2,1 \cdot 10^{-4}$	$1,7 \cdot 10^{-4}$	$2,3 \cdot 10^{-4}$	$5,0 \cdot 10^{-4}$
Propionaldehyd						$1,4 \cdot 10^{-4}$
Butyraldehyd						$1,0 \cdot 10^{-5}$
Benzaldehyd			$9,7 \cdot 10^{-5}$ ⁷⁾			$3,1 \cdot 10^{-3}$
Acrolein						$1,2 \cdot 10^{-4}$

Literatur:

1. LUTSDORF und MEGNET (1968)
2. BLAIR und VALLEE (1966)
3. WINER (1958)
4. PAPENBERG et al. (1965)
5. diese Arbeit
6. THEORELL und CHANCE (1951)
7. GRAVES et al. (1965)

Tab. 12: Scheinbare Michaeliskonstanten und maximale Reaktionsgeschwindigkeiten der Chironomus-ADH

Substrat	Km (M)	Vmax (U)
Äthanol	$2,5 \cdot 10^{-3}$	14
Propanol-1	$9,1 \cdot 10^{-4}$	6,3
Butanol-1	$5,9 \cdot 10^{-4}$	6,3
Hexanol-1	$1,7 \cdot 10^{-4}$	5,9
Hexanol-3	$7,7 \cdot 10^{-4}$	6,7
1,6-Hexandiol	$4,0 \cdot 10^{-4}$	6,5
Oktanol	$4,0 \cdot 10^{-4}$	8,7
Formaldehyd	$3,7 \cdot 10^{-3}$	8,4
Acetaldehyd	$5,0 \cdot 10^{-4}$	190
Propionaldehyd	$1,4 \cdot 10^{-4}$	35
Butyraldehyd	$1,1 \cdot 10^{-5}$	45
Benzaldehyd	$3,1 \cdot 10^{-3}$	17
Acrolein	$1,2 \cdot 10^{-4}$	16

3.3.3.8 Coenzymspezifität der Chironomus-ADH

Chironomus-ADH ergab mit NADP bzw. NADPH_2 kaum nachweisbare Enzymaktivitäten. Diese Extrem niedrigen Aktivitäten werden möglicherweise durch Verunreinigungen der NADP-Präparate mit NAD hervorgerufen. EBIZUSAKI und BARRON (1957) haben an Hefe-ADH Vergleichbares festgestellt. PULLMAN et al. (1952) haben eine Aktivität der Pferdeleber-ADH mit NADP als Coenzym beobachtet, die jedoch nur 1% der Aktivität mit NAD beträgt. Mit chromatographisch gereinigten NADP und NADPH_2 -Präparaten konnten ähnliche Anfangsgeschwindigkeiten der Alkoholyoxydation und Aldehydreduktion erreicht werden wie mit NAD bzw. NADH_2 als Coenzym (DALZIEL und DICKINSON 1965), jedoch ist die

Michaeliskonstante mit NADP um zwei Zehnerpotenzen größer als die mit NAD. Fischleber-ADH ergibt mit kommerziellen NADP-Präparaten 20% der Aktivität, die mit NAD erzielt wird (BOERI et al. 1954). In Tab. 13 sind die scheinbaren Michaeliskonstanten für die Coenzyme verschiedener Tiere aufgeführt. Bemerkenswert ist die hohe Michaeliskonstante für NADH_2 der Chironomus-ADH.

Tab. 13: Scheinbare Michaeliskonstanten für die Coenzyme verschiedener Spezies

Spezies	NADH_2 (M)	NAD (M)	Literatur
Mensch	$2,2 \cdot 10^{-5}$	$1,1 \cdot 10^{-4}$	1
Rhesusaffe I	$6,8 \cdot 10^{-5}$	$9,9 \cdot 10^{-5}$	2
II	$5,9 \cdot 10^{-6}$	$1,6 \cdot 10^{-4}$	
Pferd	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$1,0 \cdot 10^{-5}$	3
Saccharomyces II	$0,3 \cdot 10^{-6}$	$0,4 \cdot 10^{-3}$	4
IV	$0,2 \cdot 10^{-6}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$	
Chironomus	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$	5

- Literatur:
1. von WARTBURG et al. (1964)
 2. PAPENBERG et al. (1965)
 3. THEORELL et al. (1955)
 4. LUTSDORF und MEGNET (1968)
 5. diese Arbeit

3.3.3.9 Inhibition der ADH

3.3.3.9.1 Inhibition durch Metallkomplexbildner

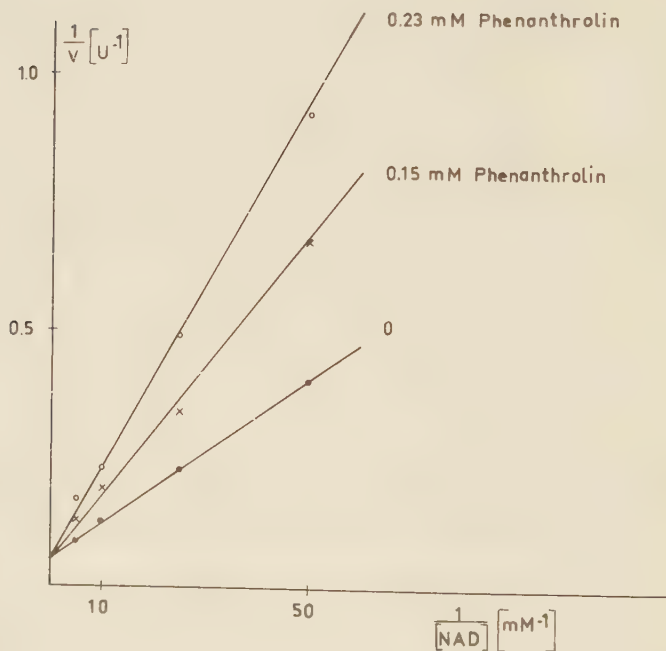
Es ist bekannt, daß bei den ADH verschiedener Spezies, z.B. Pferdeleber-, Menschenleber-, Hefe-ADH, Zink an der katalytischen Aktivität beteiligt ist. (VALLEE und HOCH 1955, 1957; HOCH und VALLEE 1956, WALLENFELS et al. 1957, VALLEE und COOMBS 1959, VALLEE et al. 1959, PLANE und THEORELL 1961, PLANE und LONG 1963, DALZIEL 1963, ÅKESON 1964, von WARTBURG et al. 1964, DRUYAN und VALLEE 1964, SANDLER und McKAY 1969, DRUM et al. 1967, 1969; DRUM und VALLEE 1970). Inhibitionsversuche mit den Metallkomplexbildnern o-Phenanthrolin und α, α -Bipyridin an Chironomus-ADH unter Konstanthaltung der Coenzym- bzw. der Substratkonzentration zeigten eine verminderte Aktivität nach Zugabe eines dieser Präparate. In Abb. 11 und 12 sind die Ergebnisse im $1/v$ gegen $1/s$ -Diagramm nach LINEWEAVER und BURK (1934) dargestellt. Sowohl o-Phenanthrolin als auch α, α -Bipyridin ergaben eine kompetitive Hemmung mit den Coenzymen NAD und NADH_2 . Dieses deutet darauf hin, daß ein enzymgebundenes Metall an der Coenzymbindung beteiligt ist. Bei Variation der Substrat- und Konstanthaltung der Coenzymkonzentration konnte man für o-Phenanthrolin/Äthanol eine nicht-kompetitive, für α, α -Bipyridin/Äthanol eine kompetitive Hemmung feststellen. Die Ergebnisse der Aldehydreduktion waren nicht eindeutig.

Ein Vergleich mit den Inhibitionsuntersuchungen von Metallkomplexbildnern an den ADH anderer Spezies zeigt übereinstimmende Ergebnisse in der kompetitiven Hemmung des Coenzym (PLANE und THEORELL 1961). Unterschiedliche Resultate ergaben sich für die Art der Inhibition mit den Substraten (VALLEE et al. 1959, PLANE und THEORELL 1961). Trotz intensiver Untersuchungen an Pferdeleber-ADH ist die Bedeutung des enzymgebundenen Zink noch nicht geklärt. Bisherige Untersuchungsergebnisse deuten auf eine doppelte Rolle des Zink hin:

1. Beteiligung an der Katalyse
2. Stabilisierende Wirkung auf die Proteinstruktur (DRUM et al. 1967, 1969;

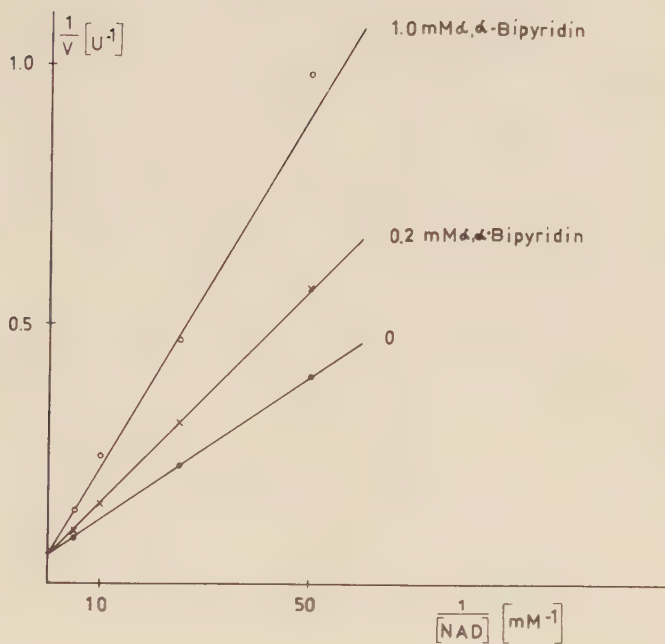
SIGMAN 1967, OPPENHEIMER et al. 1967, HOAGSTROM et al. 1969, WEINER 1969)

Abb. 11: Inhibition der ADH mit o-Phenanthrolin



Test: NAD-Konzentration variiert, 35 mM Äthanol,
Natriumpyrophosphat/Glycin-Puffer, 0,02 M, pH 8,5.

Abb. 12: Inhibition der ADH mit λ,λ -Bipyridin



Test: NAD-Konzentrationen variiert, 35 mM Äthanol,
0,02 M Natriumpyrophosphat/Glycin-Puffer, pH 8,5

3.3.3.9.2 Inhibition durch Merkaptidbildung und Alkylierung

Verschiedene Dehydrogenasen besitzen in jedem aktiven Zentrum eine Thiolgruppe, die für die enzymatische Aktivität wichtig ist (LI und VALLEE 1965, SNODGRASS et al. 1960, BOERI et al. 1954, WALLENFELS und SUND 1957, WITTER 1960, HOCH und VALLEE 1960, BUEHNER und SUND 1969). Zwei der 24 Thiolgruppen der Pferdeleber-ADH können durch Jodessigsäure unter Verlust von enzymatischer Aktivität alkyliert werden (LI et al. 1963, LI und VALLEE 1965, HARRIS 1964, EVANS und RABIN 1968, REYNOLDS und McKINLEY-McKEE 1969, 1970). Die Funktion dieser beiden SH-Gruppen ist noch nicht geklärt. Es wird vermutet, daß sie an der Stabilisierung der Enzymkonformation beteiligt sind (REYNOLDS und McKINLEY-McKEE 1969).

Versuche mit Jodessigsäure als alkylierendes und PCMB als Merkaptidbildendes Reagenz an Chironomus-ADH ergaben bei beiden Reagentien einen Aktivitätsverlust. PCMB zeigt mit NAD und NADH_2 eine kompetitive Hemmung (Abb. 14), ebenso Jodessigsäure mit NAD (Abb. 13).

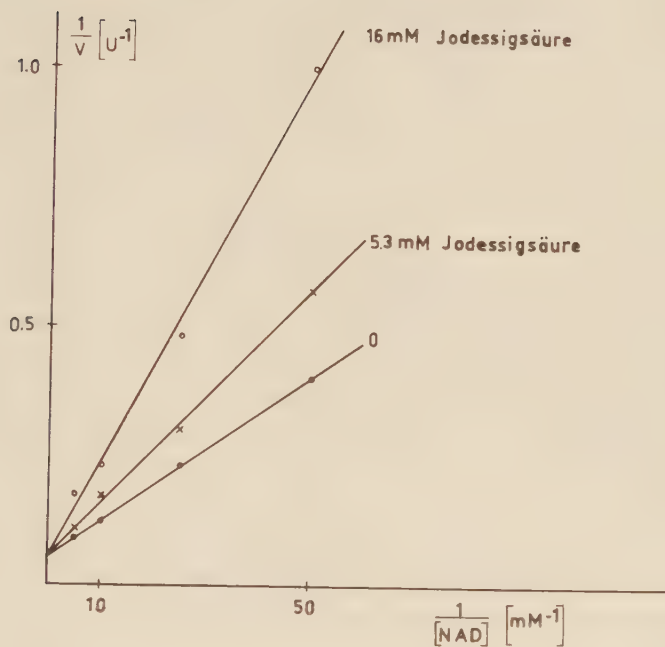
Die Messungen mit NADH_2 führten zu uneindeutigen Ergebnissen. Die Untersuchungen ergaben, daß auch bei der enzymatischen Aktivität der Chironomus-ADH SH-Gruppen von Bedeutung sind. Um genauere Aussagen über ihre Funktion zu erhalten, sind weitere Untersuchungen, z. B. multiple Inhibitionen, notwendig.

3.3.3.9.3 .Inhibition durch Strukturanaloga der Substrate

Fettsäuren bilden ternäre Komplexe mit Pferdeleber-ADH-NAD und bewirken eine kompetitive Hemmung mit Alkohol. Fettsäureamide bilden ternäre Komplexe mit ADH- NADH_2 und bewirken eine kompetitive Hemmung mit Aldehyd (WINER und THEORELL 1959, 1960; WORONOCK 1961, 1963; WITTER 1960, SIGMAN und WINTER 1970).

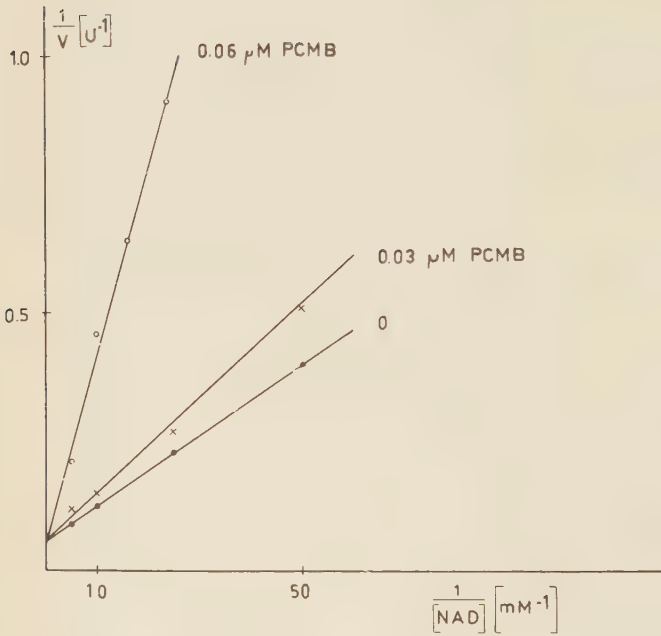
Die Ergebnisse der Inhibitionsversuche an Chironomus-ADH mit den Fettsäuren Essig- und Buttersäure, bzw. den Fettsäureamiden Acet- und Butyramid sind in Tab. 14 aufgeführt.

Abb. 13: Inhibition der ADH mit Jodessigsäure



Test: NAD-Konzentrationen variiert, 35 mM Äthanol,
0,02 M Natriumpyrophosphat/Glycin-Puffer,
pH 8,5.

Abb. 14: Inhibition der ADH mit PCMB



Test: NAD-Konzentrationen variiert, 35 mM Äthanol,
 0,02 M Natriumpyrophosphat/Glycin-Puffer,
 pH 8,5.

Tab. 14: Art der Inhibition von Fettsäuren und Fettsäureamiden mit Chironomus-ADH

Inhibitor	NADH ₂ variiert	NAD variiert	Acetald. variiert	Äthanol variiert
Acetamid	unkomp.	unkomp.	komp.	-
Butyramid	unkomp.	-	komp.	-
Essigsäure	unkomp.	-	-	-
Buttersäure	-	-	-	-

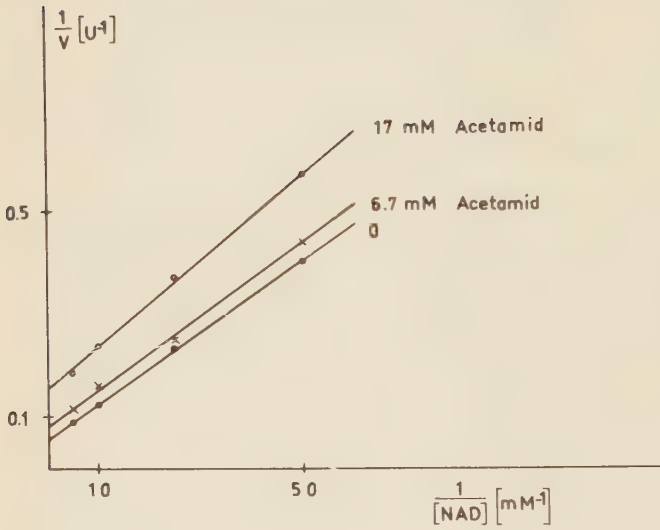
- keine eindeutigen Ergebnisse

Die unkompetitive Inhibition mit den Coenzymen deuten darauf hin, daß durch die Einwirkung der Inhibitoren sowohl die Umsatzgeschwindigkeit als auch der Km-Wert für das Coenzym herabgesetzt werden (Abb. 15). Die Untersuchungen mit Fettsäuren führen zu uneindeutigen Ergebnissen. Fettsäureamide bewirken mit Acetaldehyd eine kompetitive Hemmung. Es ist anzunehmen, daß Acetamid und Butyramid als Strukturanaloga zu Acetaldehyd die kompetitive Hemmung verursachen.

Fluoroäthanol als Analogon zu Äthanol wurde auf seine Hemmwirkung an Chironomus-ADH geprüft. Wie erwartet, trat eine kompetitive Hemmung zum Äthanol auf. Bei Variation der Coenzymkonzentrationen NAD und NADH₂ zeigt Fluoroäthanol eine nicht-kompetitive Hemmung.

An den Hemmversuchen ist festzustellen, daß alle untersuchten Inhibitor-Gruppen jeweils die gleiche Art der Hemmung beim oxydierten und reduzierten Coenzym aufweisen. Daraus ergibt sich, daß sowohl NAD als auch NADH₂ den gleichen Bindungsort am Enzym haben.

Abb. 15: Inhibition der ADH mit Acetamid



Test: NAD-Konzentrationen variiert, 35 mM Äthanol,
0,02 M Natriumpyrophosphat/Glycin-Puffer,
pH 8,5.

3.3.3.10 Allgemeine Kinetik der ADH

Die Abb. 17 und 19 geben die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration bei verschiedenen, jeweils während einer Meßreihe konstant gehaltenen Coenzymkonzentration wieder, aufgetragen im $1/v$ gegen $1/s$ -Diagramm nach LINEWEAVER und BURK (1934). Aus den Abbildungen ist zu ersehen, daß die Steigung der Geraden von der Konzentration des konstant gehaltenen Coenzym abhängig ist und damit nicht direkt den Reziprokwert der Michaeliskonstanten wiedergibt. Nach ALBERTY (1953) und DALZIEL (1957) kann man diesen aus LINEWEAVER und BURK-plots erhalten, indem man die Reaktionsgeschwindigkeiten bei variabler Substratkonzentration bei verschiedenen, jeweils in einer Meßreihe konstant gehaltenen Coenzymkonzentration mißt und umgekehrt. ALBERTY (1953) stellte für Bi-Substrat-Reaktionen folgende Beziehungen zwischen der Anfangsgeschwindigkeit v , den Anfangskonzentrationen (a , b) des Coenzym A und des Substrates B, den kinetischen Konstanten K_A , K_B und K_{AB} und der Maximalgeschwindigkeit V , auf:

$$\frac{V_h}{v} = 1 + \frac{K_A}{a} + \frac{K_B}{b} + \frac{K_{AB}}{ab} \quad (1)$$

Umformungen der Gleichung (1) ergeben:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_h} \left[\frac{1}{a} \left(K_A + \frac{K_{AB}}{b} \right) + \left(1 + \frac{K_B}{b} \right) \right] \quad (1a)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_h} \left[\frac{1}{b} \left(K_B + \frac{K_{AB}}{a} \right) + \left(1 + \frac{K_A}{a} \right) \right] \quad (1b)$$

Für $\frac{1}{a} = 0$, d.h. für den Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate ergibt sich aus (1a):

$$I_1 = \frac{K_B}{V_h} \quad \frac{1}{b} + \frac{1}{V_h} \quad (2a)$$

Aus Gleichung (1a) ergibt sich für die Steigung der Geraden:

$$S_1 = \frac{K_{AB}}{V_h} \quad \frac{1}{b} + \frac{K_A}{V_h} \quad (2b)$$

Aus Gleichung (1b) ergibt sich für den Schnittpunkt der Geraden mit der Ordinate:

$$I_2 = \frac{K_A}{V_h} \quad \frac{1}{a} + \frac{1}{V_h} \quad (3a)$$

Für die Steigung der Geraden ergibt sich aus Gleichung (1b):

$$S_2 = \frac{K_{AB}}{V_h} \quad \frac{1}{a} + \frac{K_B}{V_h} \quad (3b)$$

Wenn Chironomus-ADH der Gleichung (1) folgt, müssen folgende Bedingungen erfüllt werden:

1. Die Anfangsgeschwindigkeiten bei konstanter Konzentration des Substrats b und variabler Konzentration des Coenzyms a ergeben im $1/v$ gegen $1/a$ -Diagramm eine Gerade (Primärplot), deren Steigung und Schnittpunkt mit der Ordinate eine lineare Funktion von $1/b$ ist.
2. Die aus einer Serie solcher Messungen mit verschiedenen b erhaltenen Steigungen bzw. Ordinatenabschnitte der Primärplots ergeben gegen $1/b$ aufgetragen jeweils Geraden (Sekundärplots), aus deren Steigung und Ordinatenabschnitt die Werte für V , K_A , K_B und K_{AB} hervorgehen.
3. Die Anfangsgeschwindigkeiten bei konstanter Konzentration des Coenzyms a und variabler Konzentration des Substrats b ergeben im $1/v$ gegen $1/b$ -Diagramm eine Gerade, deren Steigung und Schnittpunkt eine lineare Funktion von $1/a$ ist.
4. Die aus einer Serie solcher Messungen mit verschiedenen a erhaltenen Steigungen bzw. Ordinatenabschnitte der Primärplots ergeben gegen $1/a$ aufgetragen jeweils Geraden, aus deren Steigung und Ordinatenabschnitt wiederum die Werte für V , K_A , K_B und K_{AB} zu entnehmen sind.

5. Die nach (2) und (4) erhaltenen Werte der Konstanten sollten im Rahmen ihrer Fehlergrenzen übereinstimmen.

Für die Alkoholoxydation der Chironomus-ADH sind für

a - NAD-Konzentration

b - Alkoholkonzentration

V_h - Maximalgeschwindigkeit der Alkoholoxydation

$\left. \begin{array}{l} K_A \\ K_B \\ K_{AB} \end{array} \right\}$ entsprechende kinetische Konstanten, Definition s. u.

einzusetzen.

Für die Aldehydreduktion gilt entsprechend Gleichung (1):

$$\frac{V_r}{v} = 1 + \frac{K_C}{c} + \frac{K_D}{d} + \frac{K_{CD}}{cd} \quad (4)$$

wobei

c - NADH_2 -Konzentration

d - Aldehydkonzentration

$\left. \begin{array}{l} K_C \\ K_D \\ K_{CD} \end{array} \right\}$ entsprechende kinetische Konstanten, Definition s. u.

V_r - Maximalgeschwindigkeit der Aldehydreduktion bedeuten.

Nach ALBERTY (1953) sind die kinetischen Konstanten wie folgt definiert:

$$V_h = \frac{k_3 k_4 e_0}{k_3 + k_4}$$

$$K_A = \frac{k_3 k_4}{k_1 (k_3 + k_4)}$$

$$K_B = \frac{k_4 (k_{-2} + k_3)}{k_2 (k_3 + k_4)}$$

$$K_{AB} = \frac{k_{-1} k_4 (k_{-2} + k_3)}{k_1 k_2 (k_3 + k_4)}$$

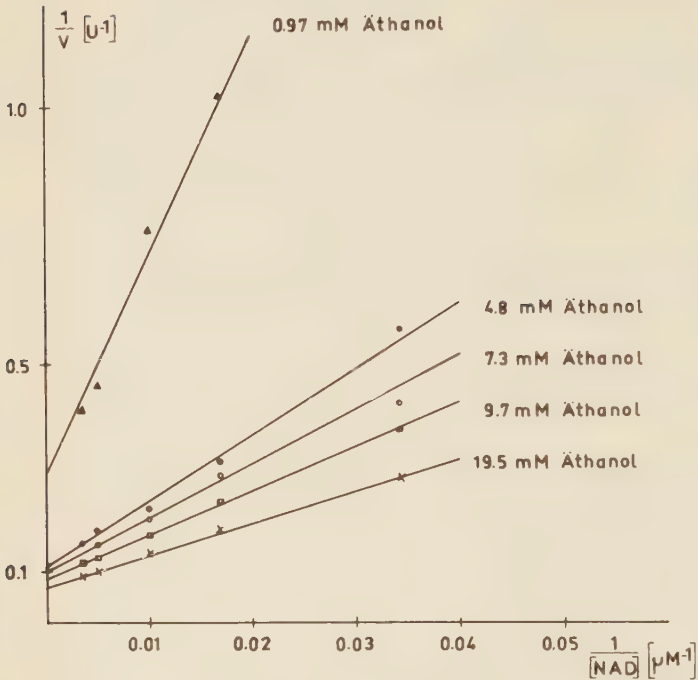
$$V_r = \frac{k_{-1} k_{-2} e_0}{k_{-1} + k_{-2}}$$

$$K_C = \frac{k_{-1} k_{-2}}{k_{-4} (k_{-1} + k_{-2})}$$

$$K_D = \frac{k_{-1} (k_{-2} + k_3)}{k_{-3} (k_{-1} + k_{-2})}$$

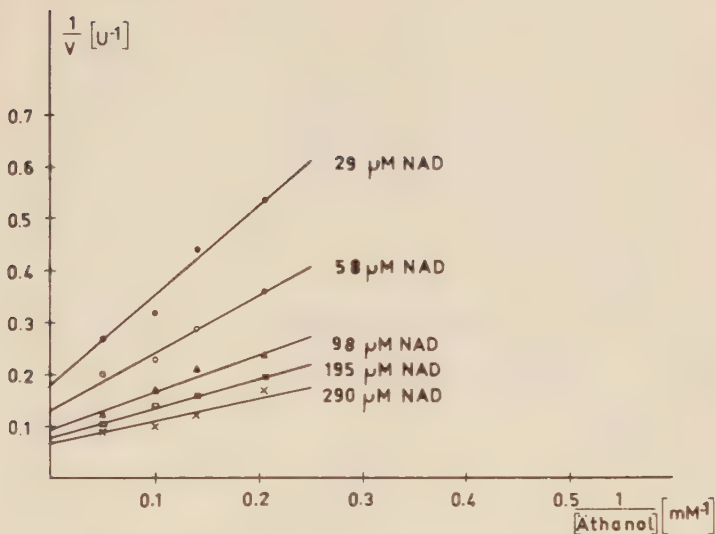
$$K_{CD} = \frac{k_{-1} k_4 (k_{-2} + k_3)}{k_{-3} k_{-4} (k_{-1} + k_{-2})}$$

Abb. 16: Primärplots: $\frac{1}{v}$ gegen $\frac{1}{(NAD)}$ $\hat{=}$ $1/a$



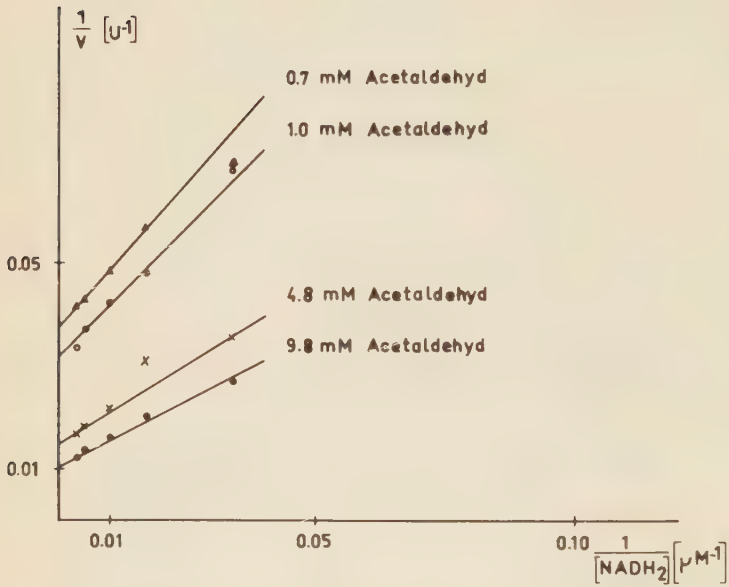
Darstellung der Meßwerte im Diagramm entsprechend Gleichung (1a). Die Anfangskonzentrationen des Äthanols sind dem Diagramm zu entnehmen. Sie wurden jeweils während einer Meßreihe konstant gehalten. Die NAD-Konzentrationen wurden variiert. Es wurde Natriumpyrophosphat/Glycin-Puffer verwendet, pH 8,5, 0.02 M.

Abb. 17: Primärplots $1/v$ gegen $\frac{1}{[\text{Äthanol}]}$ $\hat{=}$ $1/b$



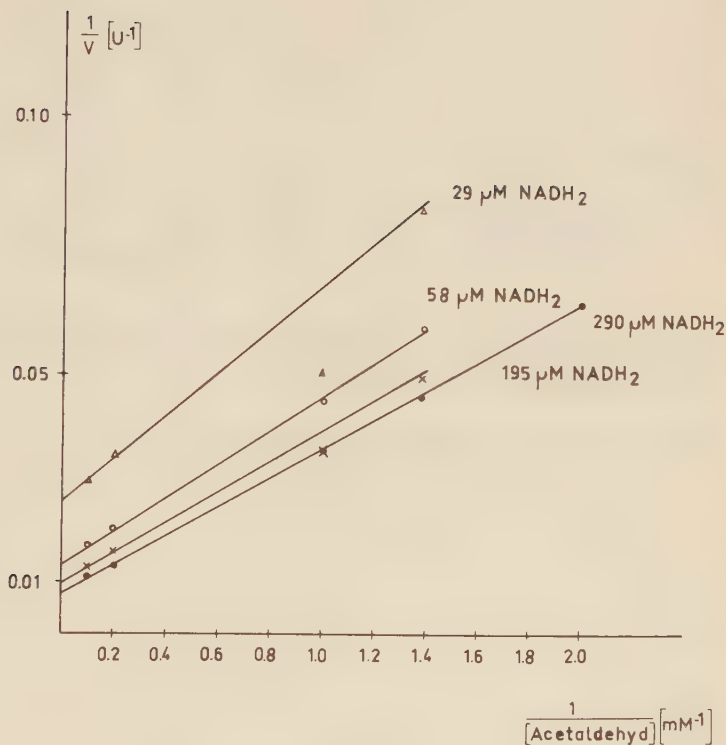
Darstellung der Meßwerte im Diagramm entsprechend Gleichung (1b). Test s. 2.4 und Legende Abb. 16.

Abb. 18: Primärplots: $1/v$ gegen $1/(\text{NADH}_2) \hat{=} 1/c$



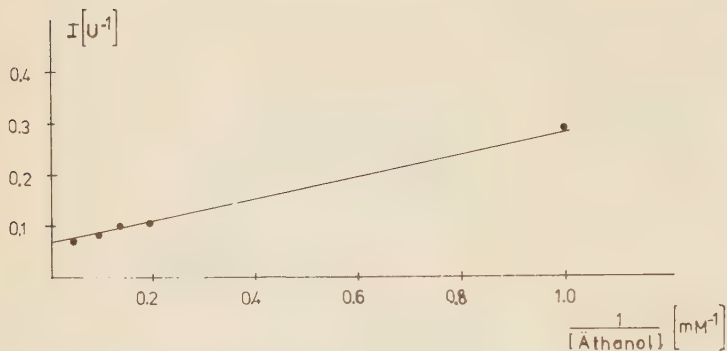
Test s. 2.4 und Legende Abb. 19.

Abb. 19: Primärplots: $1/v$ gegen $1/(\text{Acetaldehyd}) \triangleq \frac{1}{d}$



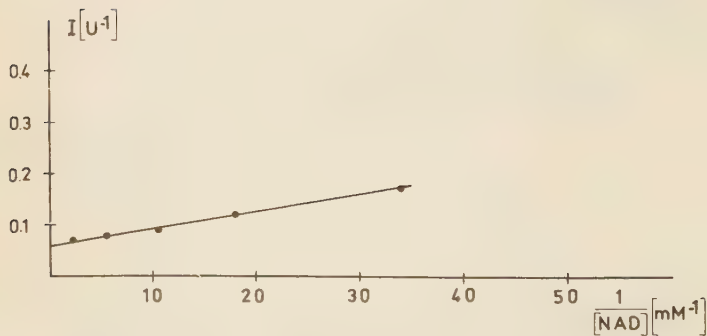
Die Messungen wurden in $0,025 \text{ M KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer durchgeführt, pH 7,0. Die im Diagramm angegebenen NADH_2 -Konzentrationen wurden während einer Meßreihe konstant gehalten, die Acetaldehyd-Konzentrationen variiert.

Abb. 20: Diagramm der Ordinatenabschnitte aus Abb. 16



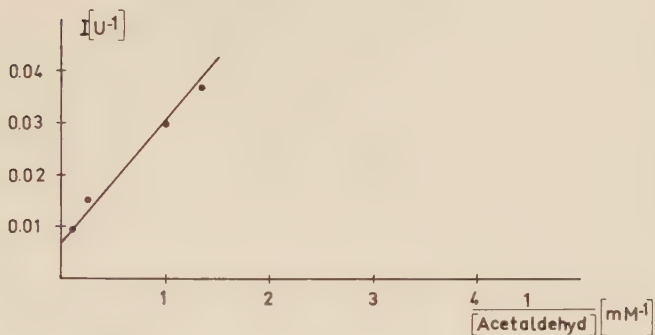
Aus diesem Diagramm: $V_h = 14,7 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/mg} \cdot \text{min}$, $K_{\text{Äth}} = 3,3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
 Darstellung entsprechend Gleichung (2a)

Abb. 21: Diagramm der Ordinatenabschnitte aus Abb. 17



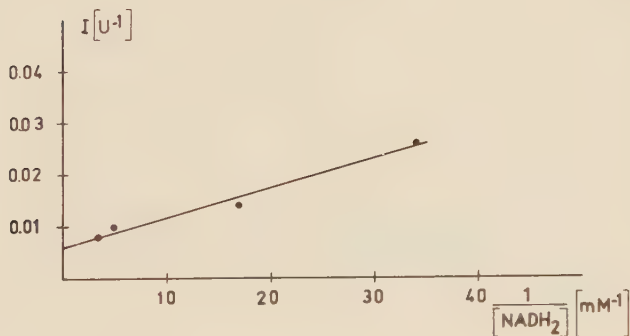
Aus diesem Diagramm: $V_h = 16,7 \cdot 10^{-6} \text{ Mol/mg} \cdot \text{min}$, $K_N = 6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
 Darstellung entsprechend Gleichung (3a)

Abb. 22: Ordinatenabschnitte aus Abb. 18



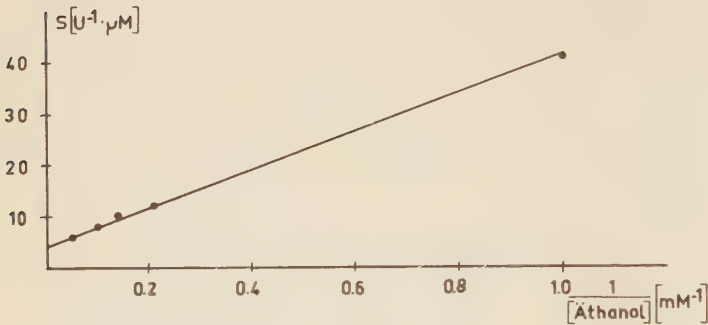
Aus diesem Diagramm: $V_r = 143 \cdot 10^{-6}$ Mol/mg.min, $K_{NH} = 3,3 \cdot 10^{-3}$ M

Abb. 23: Diagramm der Ordinatenabschnitte aus Abb. 19



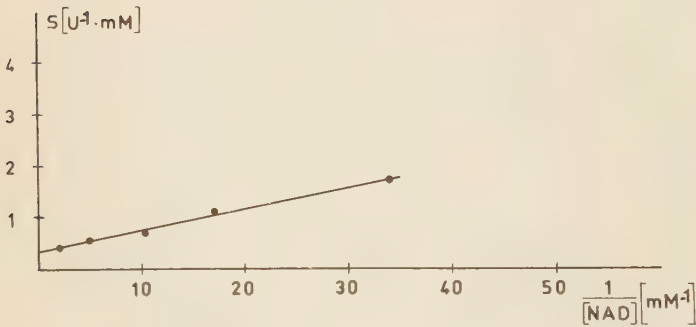
Aus diesem Diagramm: $V_r = 167 \cdot 10^{-6}$ Mol/mg.min, $K_{Ac} = 8,7 \cdot 10^{-5}$ M

Abb. 24: Diagramm der Steigungen aus Abb. 16



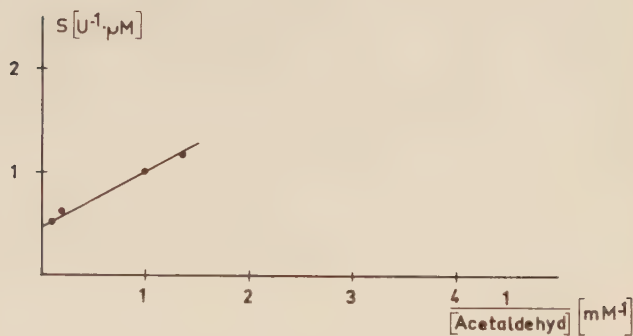
Aus diesem Diagramm: $K_N = 6,6 \cdot 10^{-5} \text{M}$, $K_{N\ddot{\text{A}}\text{th}} = 5,4 \cdot 10^{-7} \text{M}^2$
 Darstellung entsprechend Gleichung (2b)

Abb. 25: Diagramm der Steigungen aus Abb. 17



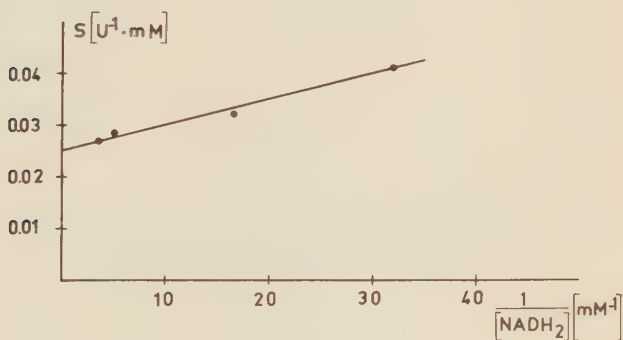
Aus diesem Diagramm: $K_{\ddot{\text{A}}\text{th}} = 5,8 \cdot 10^{-3} \text{M}$, $K_{N\ddot{\text{A}}\text{th}} = 6,5 \cdot 10^{-7} \text{M}^2$
 Darstellung entsprechend Gleichung (3b)

Abb. 26: Diagramm der Steigungen aus Abb. 18



Aus diesem Diagramm: $K_{\text{Ac}} = 6,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, $K_{\text{NHAc}} = 7,8 \cdot 10^{-8} \text{ M}^2$

Abb. 27: Diagramm der Steigungen aus Abb. 19



$K_{\text{NH}} = 4,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $K_{\text{NHAc}} = 7,5 \cdot 10^{-8} \text{ M}^2$

Die Ergebnisse der Messungen mit Chironomus-ADH führten zu linearen Primärplots, sowohl in den $1/v$ gegen $1/a$ - als auch in den $1/v$ gegen $1/b$ -Diagrammen, sowohl für die Alkoholoxydation als auch für die Aldehydreduktion. Ebenso zeigten sämtliche sich daraus ergebenden Sekundärplots lineare Abhängigkeiten. Daraus folgt, daß die Reaktion der Chironomus-ADH grundsätzlich von der Gleichung (1) beschrieben wird.

In Tab. 15 sind die Mittelwerte der aus den Abb. 20-27 erhaltenen Konstanten der Chironomus-ADH, verglichen mit denen der Pferdeleber-ADH, zusammengestellt.

Tab. 15 Kinetische Konstanten der Chironomus- und Pferdeleber-ADH

Konstanten	Pferdeleber ¹⁾	Chironomus ²⁾
V_h		$15,7 \cdot 10^{-6}$ Mol/mg min
V_r		$155 \cdot 10^{-6}$ Mol/mg min
$K_{\text{Äth}}$	$1,8 \cdot 10^{-4}$ M	$4,6 \cdot 10^{-3}$ M
K_{Ac}		$7,6 \cdot 10^{-5}$ M
K_N	$3,0 \cdot 10^{-6}$ M	$6,3 \cdot 10^{-5}$ M
K_{NH}	$1,3 \cdot 10^{-5}$ M ³⁾	$3,8 \cdot 10^{-3}$ M
$K_{\text{NÄth}}$		$5,9 \cdot 10^{-7}$ M
K_{NHAc}		$7,7 \cdot 10^{-8}$ M

Literatur: 1) DALZIEL und DICKINSON (1966)

2) diese Arbeit

3) DALZIEL und DICKINSON (1965)

3.3.3.11 Reaktionsmechanismus der ADH

ALBERTY (1953) und DALZIEL (1957) zeigen, daß Gleichung (1) von zwei grundsätzlich verschiedenen der prinzipiell möglichen Reaktionsmechanismen erfüllt wird:

1. Coenzym und Substrat werden in zufälliger Reihenfolge an das Enzym angelagert. Dabei können vier binäre und zwei ternäre Komplexe entstehen. Die Gleichgewichtseinstellung zum freien Substrat erfolgt schnell, so daß die intramolekulare Reaktion des Ternärkomplexes der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist (DALZIEL 1957). Dieser Mechanismus wird als "random sequence"-Mechanismus bezeichnet.
2. Die Anlagerung der Reaktionspartner erfolgt nacheinander in einer bestimmten Reihenfolge, d.h. in jeder Reaktionsrichtung wird nur ein Binärkomplex gebildet. Bei diesem, als "ordered sequence"-Mechanismus bezeichneten System ist die Unterscheidung zweier Reaktionsabläufe möglich:
 - a) Die Ternärkomplexe können nachgewiesen werden und nehmen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit ("ternary complex"-Mechanismus).
 - b) Die Ternärkomplexe sind sehr kurzlebig, verglichen mit den Binärkomplexen ("Theorell-Chance"-Mechanismus).

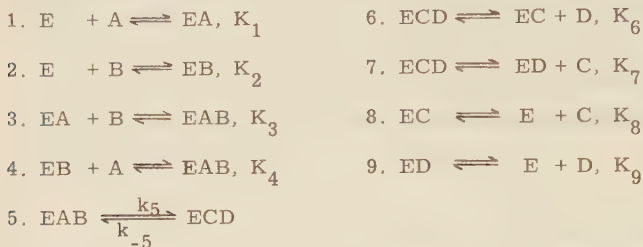
ALBERTY (1958) konnte zeigen, daß durch Analysen von Produkt-hemmversuchen sowohl eine Unterscheidung der "random sequence"- und der "ordered sequence"-Mechanismen als auch der "ternary complex"- und der "Theorell-Chance"-Mechanismen möglich ist. Aus dem von ihm aufgestellten Gleichungen sind durch Umformung und Koeffizientenvergleich die Veränderungen der Konstanten V , K_A , K_B und K_{AB} festgestellt und zum Vergleich der verschiedenen Reaktionsmechanismen in Tab. 16 zusammengestellt worden.

Eine enzymkatalysierte Zwei-Substrat-Reaktion kann in der folgenden allgemeinen Form dargestellt werden:



wobei A und C oxydiertes und reduziertes Coenzym B, und D Substrat und Produkt bedeuten können.

Der "random sequence"-Mechanismus verläuft dann nach folgendem Schema (ALBERTY 1953)



K_1 bis K_9 sind dabei die Dissoziationskonstanten der einzelnen Reaktionsschritte. Es muß an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß dieser Mechanismus nur dann lineare Abhängigkeiten in der LINEWEAVER und BURK-Auftragung ergibt, wenn die intramolekulare Umsetzung des Ternärkomplexes der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist.

Aus Tab. 16 ist zu ersehen, daß bei dem "random sequence"-Mechanismus eine Zugabe der Produkte C und D nur eine Veränderung der Konstanten K_{AB} bewirkt. Alle anderen Konstanten entsprechen denen der ungehemmten Reaktion. Dieses ist auf den symmetrischen Reaktionsmechanismus zurückzuführen. Würde Chironomus-ADH diesem Reaktionssystem folgen, wäre sowohl im $1/v$ gegen $1/a$ -Diagramm als auch im $1/v$ gegen $1/b$ -Diagramm, sowohl bei der C- als auch bei der D-Inhibition eine Veränderung der Steigung der Geraden zu erwarten, bei gleichbleibendem Schnittpunkt mit der Ordinate.

Tab. 16: Zusammenstellung der Konstanten der verschiedenen Reaktionsmechanismen (nach ALBERTY 1953, 1958)

Konstanten: keine Hemmung/C als Inhibitor/D als Inhibitor

1. "random sequence"-Mechanismus

$$\begin{array}{lll}
 V : & V^C = V^O & V^D = V^O \\
 K_A : K_A^O & K_A^C = K_A^O & K_A^D = K_A^O \\
 K_B : K_B^O & K_B^C = K_B^O & K_B^D = K_B^O \\
 K_{AB} : K_{AB}^O & K_{AB}^C = 1 + \left(\frac{c}{K_8} \right) K_{AB}^O & K_{AB}^D = 1 + \left(\frac{d}{K_9} \right) K_{AB}^O
 \end{array}$$

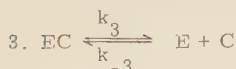
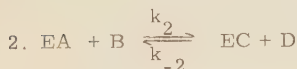
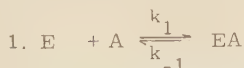
2. "Theorell-Chance"-Mechanismus

$$\begin{array}{lll}
 V : V^O & V^C = V^O & V^D = V^O \\
 K_A : K_A^O & K_A^C = 1 + \left(\frac{k_{-3}^c}{k_3} \right) K_A^O & K_A^D = K_A^O \\
 K_B : K_B^O & K_B^C = K_B^O & K_B^D = 1 + \left(\frac{k_{-2}^d}{k_3} \right) K_B^O \\
 K_{AB} : K_{AB}^O & K_{AB}^C = 1 + \left(\frac{k_{-3}^c}{k_3} \right) K_{AB}^O & K_{AB}^D = 1 + \left(\frac{k_{-2}^d}{k_3} \right) K_{AB}^O
 \end{array}$$

3. "ternary Complex"-Mechanismus

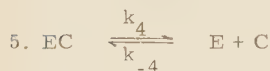
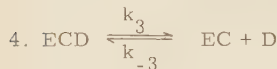
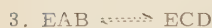
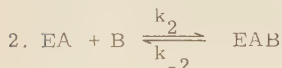
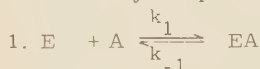
$$\begin{array}{lll}
 V : V^O & V^C = V^O & V^D = \left[\frac{k_3 + k_4}{k_3 + k_4 + k_{-3}^d} \right] V^O \\
 K_A : K_A^O & K_A^C = 1 + \left(\frac{k_{-4}^c}{k_4} \right) K_A^O & K_A^D = \left[\frac{k_3 + k_4}{k_3 + k_4 + k_{-3}^d} \right] K_A^O \\
 K_B : K_B^O & K_B^C = K_B^O & K_B^D = \left[\frac{(k_{-2} \cdot k_4 + k_3 \cdot k_4 + k_{-2} \cdot k_{-3}^d)(k_3 + k_4)}{[(k_3 + k_4 + k_{-3}^d)(k_{-2} + k_3)] k_4} \right] K_B^O \\
 K_{AB} : K_{AB}^O & K_{AB}^C = 1 + \left(\frac{k_{-4}^c}{k_4} \right) K_{AB}^O & K_{AB}^D = \left[\frac{(k_{-2} \cdot k_4 + k_3 \cdot k_4 + k_{-2} \cdot k_{-3}^d)(k_3 + k_4)}{[(k_3 + k_4 + k_{-3}^d)(k_{-2} + k_3)] k_4} \right] K_{AB}^O
 \end{array}$$

Für den "Theorell-Chance"-Mechanismus gilt folgendes Schema:



Aus Tab. 16 ist ersichtlich, daß sich der "Theorell-Chance"-Mechanismus und der "ternary complex"-Mechanismus nur unter Anwendung von D-Produkt-Inhibitionsversuchen unterscheiden lassen. C-Produkt-Inhibitoren bewirken bei beiden Mechanismen Veränderungen der Konstanten K_A und K_{AB} .

Für den "ternary complex"-Mechanismus gilt folgendes Schema:



Wenn die ADH-Reaktion nach dem "ternary complex"-Mechanismus abläuft und das Coenzym zuerst an das Enzym gebunden wird, ist bei der Inhibition mit D eine abnehmende Maximalgeschwindigkeit mit zunehmender D-Konzentration zu erwarten. Ebenso müßte eine Veränderung sämtlicher kinetischer Konstanten festzustellen sein.

In Tab. 17a und 17b sind die durch die Produktinhibition zu erwartenden Veränderungen der Ordinatenabschnitte und Steigungen der Geraden im Vergleich zur ungehemmten Reaktion für die beschriebenen Reaktions-

mechanismen aufgeführt. Dabei ist die mögliche Reihenfolge der Anlagerung der Reaktionspartner zu berücksichtigen. Zum Vergleich sind die Ergebnisse der Produktinhibitionsversuche mit Chironomus-ADH angegeben.

Tab. 17a Zusammenstellung der für die einzelnen Reaktionsmechanismen zu erwartenden Veränderungen der Ordinatenabschnitte und Steigungen der Geraden im $1/v$ gegen $1/a$ bzw. $1/b$ -Diagramm durch die Produktinhibition

Äthanoloxydation:

System	$1/v = f(1/a)$		$1/v = f(1/b)$	
	I	S	I	S
a. "random sequence"-Mechanismus:				
ABC	o	+	o	+
ABD	o	+	o	+
b. "Theorell-Chance"-Mechanismus:				
ABC	o	+	+	+
ABD	+	+	o	+
BAC	+	+	o	+
BAD	o	+	+	+
c. "ternary complex"-Mechanismus:				
ABC	o	+	+	+
ABD	+	+	+	+
BAC	+	+	+	+
BAD	o	+	+	+
d. Ergebnisse der Produktinhibition mit Chironomus-ADH:				
A+B+C	o	+	+	+
A+B+D	+	+	+	+

A = NAD C = NADH₂

B = Äthanol D = Acetaldehyd

Die Reihenfolge der Anlagerung der Reaktionspartner ist zu beachten.

o = gleiche Ordinatenabschnitte bzw. Steigungen bei der ungehemmten und gehemmten Reaktion

+

= veränderte Ordinatenabschnitte bzw. Steigungen bei der ungehemmten und gehemmten Reaktion

Tab. 17b: Zusammenstellung der für die einzelnen Reaktionsmechanismen zu erwartenden Veränderungen der Ordinatenabschnitte und Steigungen der Geraden im $1/v$ gegen $1/c$ bzw. $1/d$ -Diagramm durch die Produktinhibition

Acetaldehydreduktion:

System	$1/v = f(1/c)$		$1/v = f(1/d)$	
	I	S	I	S

a. "random sequence"-Mechanismus:

CDA	o	+	o	+
CDB	o	+	o	+

b. "Theorell Chance"-Mechanismus:

CDA	o	+	+	+
CDB	+	+	o	+
DCA	+	+	o	+
DCB	o	+	+	+

c. "ternary complex"-Mechanismus:

CDA	o	+	+	+
CDB	+	+	+	+
DCA	+	+	+	+
DCB	o	+	+	+

D

d. Ergebnisse der Produktinhibition mit Chironomus-ADH:

C+D+A	o	+	+	+
C+D+B	+	+		

A = NAD C = NADH₂
 B = Äthanol D = Acetaldehyd

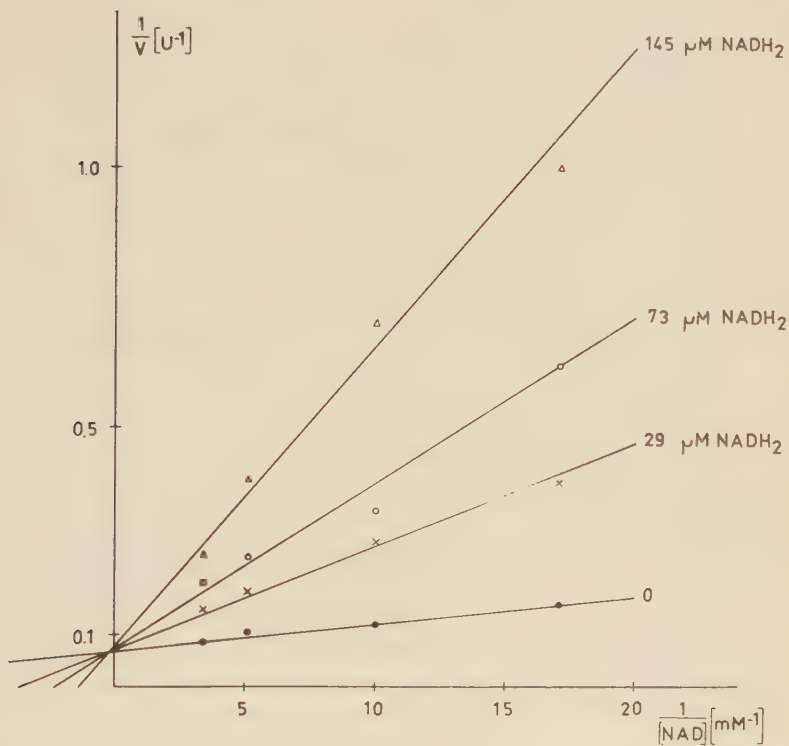
Die Reihenfolge der Anlagerung der Reaktionspartner ist zu beachten.

o = gleiche Ordinatenabschnitte bzw. Steigungen bei der ungehemmten und gehemmten Reaktion

+

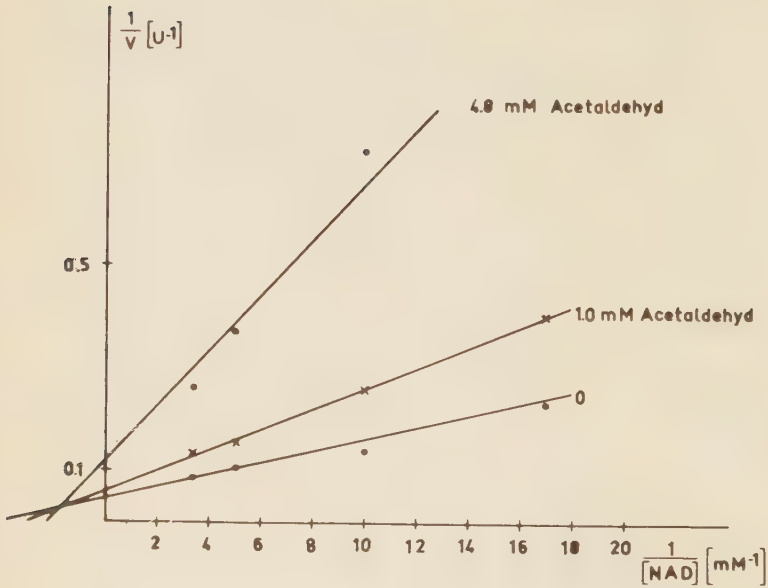
= veränderte Ordinatenabschnitte bzw. Steigungen bei der ungehemmten und gehemmten Reaktion

Abb. 28: Inhibition der Alkoholxydation mit NADH_2 ,
 ($\hat{=}$ A+B+C), aufgetragen im $1/v = f(1/a)$ -Diagramm



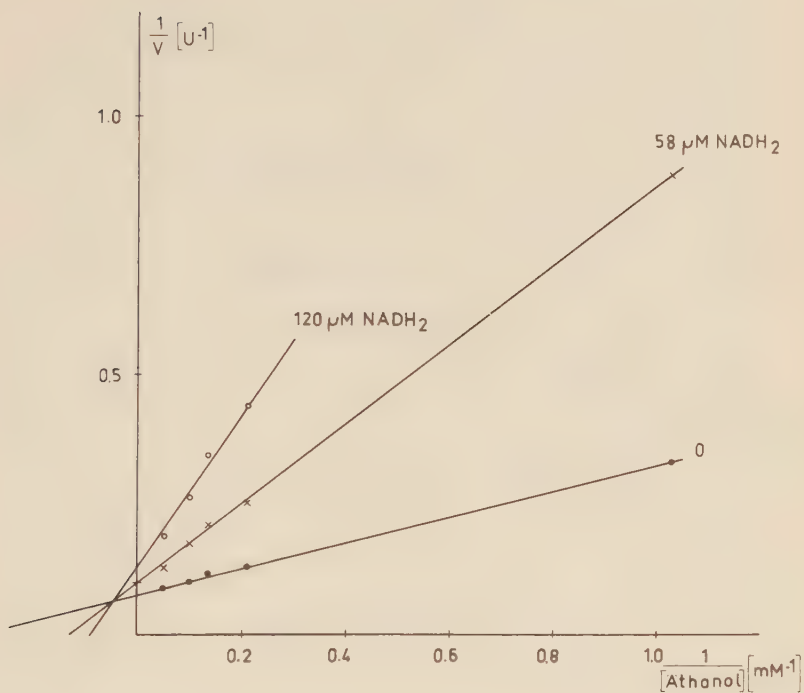
Die Messungen wurden in Natriumpyrophosphat/Glycin-Puffer, 0,02 M, pH 8,5, und bei einer Äthanolkonzentration von 35 mM.

Abb. 29: Inhibition der Alkoholoxydation mit Acetaldehyd
($\cong A+B+D$), aufgetragen im $1/v = f(1/a)$ -Diagramm



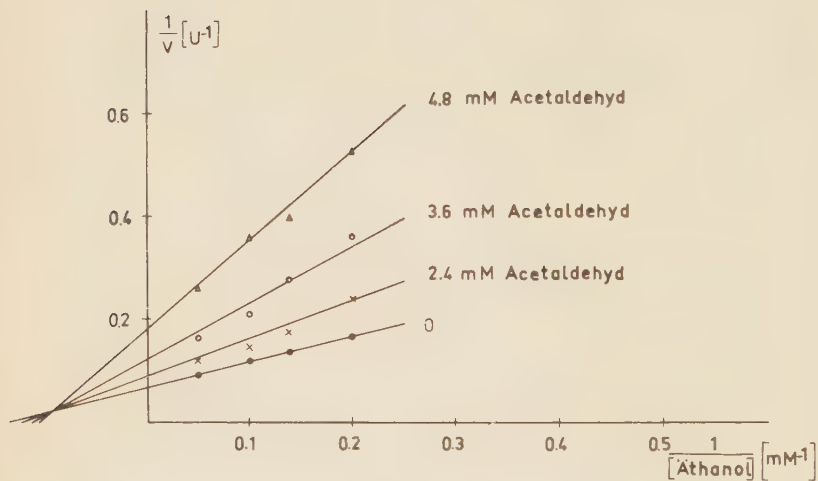
Legende entspricht der von Abb. 28

Abb. 30: Inhibition der Alkoholoxydation mit NADH_2
 ($\hat{=}$ A+B+C), aufgetragen im $1/v = f(1/b)$ -Diagramm



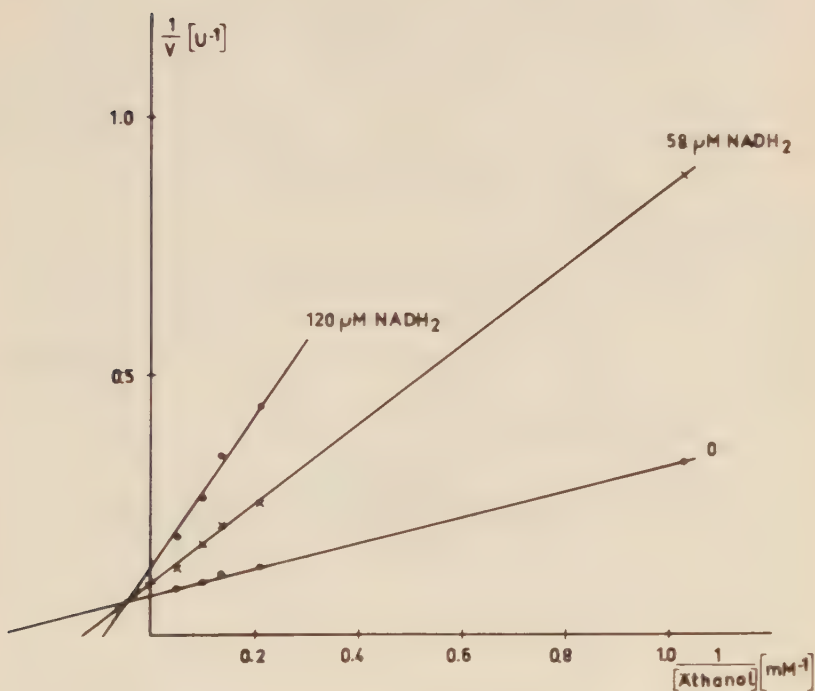
Die Messungen wurden in Natriumpyrophosphat-Puffer, pH 8,5, 0,02 M durchgeführt. Die NAD-Konzentration betrug 0,3 mM.

Abb. 31: Inhibition der Alkoholoxydation mit Acetaldehyd
 (Δ A+B+D), aufgetragen im $1/v = f(1/b)$ -Diagramm



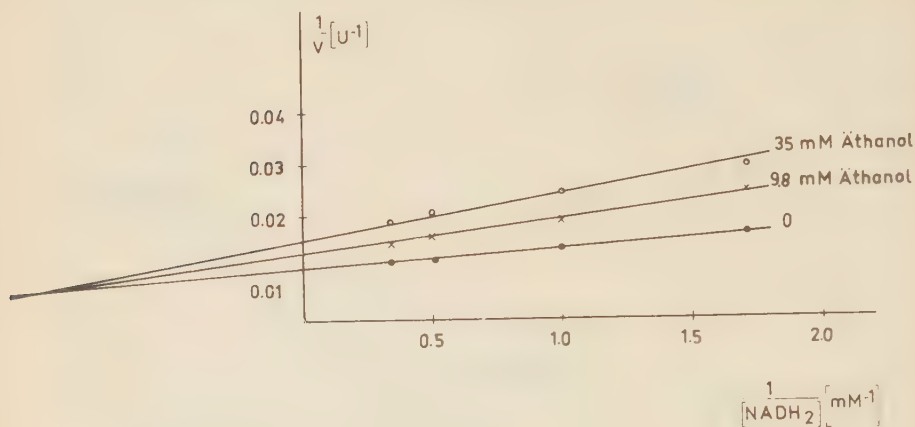
Legende entspricht der von Abb. 30

Abb. 32: Inhibition der Aldehydreduktion mit NAD

(Δ C+D+A), aufgetragen im $1/v = f(1/c)$ -DiagrammPuffer: $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 7.0, 0,025 M

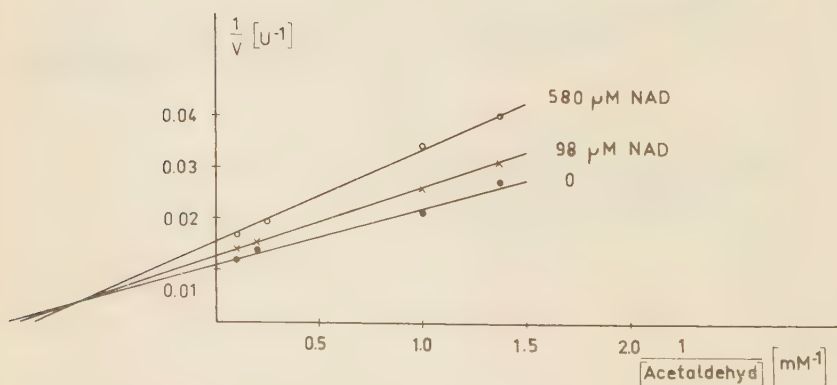
Acetaldehydkonzentration: 15 mM

Abb. 33: Inhibition der Aldehydreduktion mit Äthanol
($\hat{=}$ C+D+B), aufgetragen im $1/v = f(1/c)$ -Diagramm



Legende entspricht der von Abb. 32

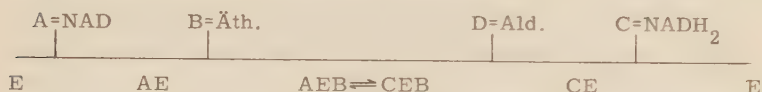
Abb. 34: Inhibition der Aldehydreduktion mit NAD
($\hat{=}$ C+D+A), aufgetragen im $1/v = f(1/d)$ -Diagramm



KH_2PO_4/Na_2HPO_4 -Puffer, 0.025 M, pH 7.0

$NADH_2$ -Konzentration: 0,3 mM

Auf der Basis dieser Ergebnisse muß angenommen werden, daß die Reaktion der Chironomus-ADH nach dem "ternary complex"-Mechanismus abläuft, wobei das Coenzym zuerst an das Enzym angelagert wird. Sowohl die Äthanoloxydation als auch die Acetaldehydreduktion erfolgen nach diesem Reaktionsmechanismus:

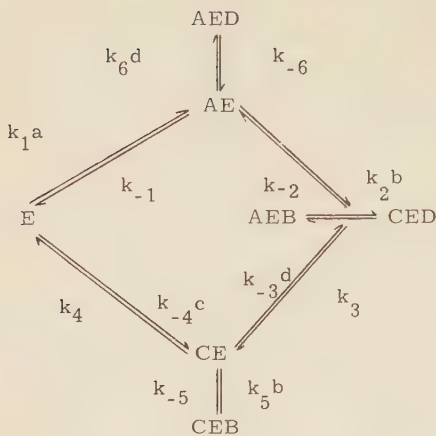


Durch Analyse von Produktinhibitionsversuchen kann nicht unterschieden werden, ob ein oder mehrere Ternärkomplexe gebildet werden.

Nach den bisherigen Ergebnissen sind folgende Reaktionen beim Chironomus-ADH-System zu berücksichtigen:

1. Die in 3.3.3.4 nachgewiesene Substratüberschußhemmung findet ihre einfachste Erklärung in der Bildung folgender Komplexe:
 - a) ein abortiver CEB-Komplex bei der Alkoholoxydation
 - b) ein abortiver AED-Komplex bei der Aldehydreduktion
2. Produktinhibition mit C kann folgendes bewirken:
 - a) A und C konkurrieren um das freie Enzym (ALBERTY 1958)
 - b) ein abortiver Dreierkomplex CEB kann gebildet werden (FROMM und NELSON 1962)
3. Produktinhibition mit D kann folgendes bewirken:
 - a) Umkehrung der Alkoholoxydation (ALBERTY 1958)
 - b) Bildung eines abortiven Komplexes AED (FROMM und NELSON 1962)
4. Der Reaktionsablauf muß dem "ternary complex"-Mechanismus folgen und das Coenzym der zuerst gebundene Reaktionspartner sein.

Daraus läßt sich folgendes, grundsätzlich auf andere Enzymsysteme übertragbare Reaktionsmodell ableiten. Es erfüllt die geforderten Bedingungen, ist jedoch das einfachste von mehreren prinzipiell möglichen.



Bei der Auswertung der aus diesem Modell abzuleitenden Reaktionsgleichungen ergibt sich, daß unter Anwendung der kinetischen Analyse von Produktinhibitionsversuchen, entstehende abortive Ternärkomplexe nachzuweisen sein müßten. Entsprechende Versuche an *Chironomus*-ADH führten zu keinem eindeutigen Ergebnis. An der Klärung dieser Fragen wird zur Zeit noch gearbeitet.

4. SCHLUßBETRACHTUNG

Ein Vergleich der kinetischen Eigenschaften der Chironomus-ADH mit denen der Hefe- und der untersuchten Wirbeltier-ADH ergibt eine weitgehende Übereinstimmung der Enzyne. Dieses Ergebnis deutet an, daß die ADH im Verlauf der Evolution keine wesentlichen, die katalytischen Eigenschaften des Enzyms betreffenden Änderungen erfahren hat. Den endgültigen Beweis würde eine Aminosäuresequenzanalyse der verschiedenen ADH erbringen. Folglich ist nicht zu erwarten, eine von den bereits bekannten in ihrem katalytischen Verhalten sehr abweichende ADH in anderen Spezies zu finden.

Die am isolierten Enzym gewonnenen kinetischen Daten und die Analyse des Reaktionsmechanismus können nur einen Hinweis auf die tatsächlich in den Organismen ablaufenden Prozesse geben. Die kinetischen Messungen werden gegenüber den Verhältnissen in der Zelle in stark verdünnten Präparaten durchgeführt. SRERE (1967) hat darauf hingewiesen, daß die kinetischen Eigenschaften eines konzentrierten Enzyms verschieden von denen eines verdünnten Enzyms sein können. Ferner haben wir keine Kenntnisse von den in der Zelle vorkommenden stationären Substrat- und Coenzymkonzentrationen oder den möglicherweise vorhandenen Inhibitor- oder Aktivatorkonzentrationen. Untersuchungen von KREBS und PERKINS (1970) ergaben z. B. eine Alkoholkonzentration in der Portalvene der Ratte von 45 μM , d. h. nur 1/47 des K_m -Wertes für Äthanol (MARKOVIC et al. 1971). Die kinetischen Daten gewinnen jedoch an Bedeutung, wenn sie im Zusammenhang mit anderen Enzymsystemen gesehen werden, z. B. bei der Konkurrenz um ein Coenzym, bei Entgiftungsprozessen, bei der Einschätzung von Regulationsmechanismen und möglichen Stoffwechselwegen.

Die physiologische Rolle der ADH scheint vorwiegend die Entgiftung exogener Alkohole zu sein (vgl. 1 und 3.1). Dafür spricht die nicht sehr ausgeprägte Substratspezifität des Enzyms. Untersuchungen von KREBS und PERKINS (1970) an der Ratte haben gezeigt, daß der im Kör-

per gebildete Alkohol größtenteils bakteriellen Ursprungs ist.

Der bei endogenen Stoffwechselprozessen gebildete Aldehyd wird sofort zu Alkohol reduziert, da das Gleichgewicht des ADH-Systems die Bildung des Alkohols begünstigt. Aldehyd kann z. B. beim Abbau von Threonin und Desoxyribosephosphat entstehen. Untersuchungen an mit Alloxan behandelten Ratten haben ergeben, daß Ratten mit erhöhtem Blutzuckergehalt ebenso einen erhöhten Alkoholgehalt zeigten (KREBS und PERKINS 1970). Diese Ergebnisse können andeuten, daß in Ausnahmesituationen Glucose über Pyruvatdecarboxylase und ADH zu Alkohol abgebaut wird.

Die Frage nach einer möglichen Beziehung des Vorkommens der ADH zu dem Auftreten ihrer Substrate im endogenen Stoffwechsel in der Umwelt, z. B. in der Nahrung, im Medium oder als Stoffwechselprodukt von Symbionten, bedarf weiterer Klärung, ebenso die Frage nach der Regulation der ADH-Aktivität.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit umfaßt die Isolierung und Charakterisierung der Alkoholdehydrogenase aus Larven der Zuckmücke *Chironomus tentans*.

1. Die ADH wurde unter Anwendung von Ammoniumsulfatfällungen, Dialyse, Ionenaustauscher-Chromatographie auf DEAE-Cellulose und Gelfiltration auf Biogel P 300 isoliert. Die gereinigten Präparate ergeben für die Äthanoloxydation eine spezifische Aktivität von 16 U/mg Protein, für die Acetaldehydreduktion 131 U/mg Protein.
2. Elektrophoretische Analysen des gereinigten Enzyms ergaben eine einzige ADH-Bande.
3. Optimale Aktivitäten wurden für die Äthanoloxydation unter folgenden Bedingungen erhalten: 35 mM Äthanol, 0.5 mM NAD, 0.02 M Natriumpyrophosphat/Glycin-Puffer, pH 8.5. Für die Acetaldehydreduktion: 15 mM Acetaldehyd, 0.5 mM NADH₂, 25 mM KH₂PO₄/Na₂HPO₄-Puffer, pH 7.0.
4. Alle untersuchten Substrate zeigten Substratüberschußhemmungen, die vermutlich auf der Bildung von Enzym-NADH₂-Alkohol-Komplexen bei der Alkoholoxydation, von Enzym-NAD-Aldehyd-Komplexen bei der Aldehydreduktion beruhen.
5. Substratspezifitätsuntersuchungen ergaben folgendes:
Äthanol, Propanol-1, Butanol-1, Hexanol-1, Hexanol-3, 1,6-Hexandiol und Oktanol wurden umgesetzt; Propanol-2, Butanol-2, Butanol-3, Hexanol-2, Cyclohexanol und Methanol hingegen nicht. Alle untersuchten Aldehyde außer D,L-Glycerinaldehyd wurden umgesetzt. Die Steroide 3 β -Hydroxy-5 β -androstanon-(17) und 17 β -Hydroxy-5 β -androstanon-(3) dienten der *Chironomus*-ADH ebenfalls als Substrat.
6. Das Enzym zeigte eine zunehmende Affinität zu Alkoholen zunehmender Kettenlänge bis zum C₆-Alkohol, beim C₈-Alkohol wird die Affinität geringer. Eine ähnliche Tendenz ist bei der Aldehydumsetzung zu beobachten.

7. Die Reaktionsgeschwindigkeiten sind mit C_2 -Alkoholen und C_2 -Aldehyden am größten.
8. Das Enzym ist inaktiv mit NADP und $NADPH_2$ als Coenzym.
9. Die Chironomus-ADH wird durch folgende Reagenzien gehemmt:
 - a) Durch die Metallkomplexbildner o-Phenanthrolin und α, α -Bipyridin.
 - b) Durch Alkylierung mit Jodessigsäure, durch Merkaptidbildung mit p-Chloromercuribenzoessäure
 - c) Durch die Strukturanaloga Essig- und Buttersäure, deren Amide und Fluoroäthanol.Daraus ergibt sich, daß ein einzymgebundenes Metall und SH-Gruppen an der ADH-Reaktion beteiligt sind.
10. Es wurden die Werte der kinetischen Konstanten festgestellt (Tab. 15).
11. Analyse von Produkthemmversuchen ergab, daß die Chironomus-ADH dem "ternary complex"-Mechanismus folgt, bei dem das Coenzym zuerst an das Enzym angelagert wird. Sowohl die Äthanol-oxydation als auch die Acetaldehydreduktion sind diesem Mechanismus zuzuordnen.

Literaturverzeichnis

- AKESON, A. (1964): On the zinc content of horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 17, 211-214
- ALBERTY, R. A. (1953): The relationship between Michaelis constants, maximum velocities and the equilibrium constant for an enzyme-catalyzed reaction. *J. Amer. chem. Soc.* 75, 1928-1932.
- ALBERTY, R. A. (1958): On the determination of rate constants for coenzyme mechanisms. *J. Amer. chem. Soc.* 80, 1777-1782
- ANDERSON, B. (1933): Über Co-Zymaseaktivierung einiger Dehydrogenasen. *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 217, 186-190
- BERGMEYER, H. U. (1962): Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstraße, S. 285
- BLAIR, A. H. and B. L. VALLEE (1966): Some catalytic properties of human liver alcohol dehydrogenase. *Biochem.* 5, 2026-2033
- BOERI, E., R. K. BONNICHSEN and Luisa TOSI (1954): Alcohol dehydrogenase from fish liver. *Publ. Staz. Zool. Napoli* 25, 427-437
- BONNICHSEN, R. K. and A. M. WASSEN (1948): Crystalline alcohol dehydrogenase from horse liver. *Arch. Biochem.* 18, 361-363
- BUCHNER, E. and R. GAUNT (1906): *Ann.* 349, 140, zit. nach SUND, H. and H. THEORELL (1963): Alcohol dehydrogenases, In BOYER, P. D., H. LARDY and K. MYRBÄCK (ed.): *The Enzymes*, Vol. 7, p. 25-83, Acad. Press, New York, London
- BUEHNER, M. and H. SUND (1969): Yeast alcohol dehydrogenase: -SH groups, disulfide groups, quaternary structure, and reactivation by reductive cleavage of disulfide groups, *Eur. J. Biochem.* 11, 73-79
- BUETTNER, H. (1965): Aldehyd- und Alkoholdehydrogenase-Aktivität in Leber und Niere der Ratte. *Biochem. Z.* 341, 300-313
- BUTLER, J. P. G., H. JOERNVALL and J. I. HARRIS (1969): The subunit size of alcohol dehydrogenates. *FEBS Letters* 2, 239-241
- DALZIEL, K. (1957): Initial steady state velocities in the evaluation of enzyme-coenzyme-substrate reaction mechanisms. *Acta Chem. Scand.* 11, 1706-1723
- DALZIEL, K. (1963): Interpretation of inhibition kinetics of coenzyme-substrate reactions, and the role of zinc in alcohol dehydrogenases. *Nature* 197, 462-464

- DALZIEL, K. and F.M. DICKINSON (1965): The activity of liver alcohol dehydrogenase with nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate as coenzyme. *Biochem. J.* 95, 311-320
- DALZIEL, K. and F.M. DICKINSON (1966): The kinetics and mechanism of liver alcohol dehydrogenase with primary and secondary alcohols as substrates. *Biochem. J.* 100, 34-46
- DALZIEL, K. and F.M. DICKINSON (1966): Substrate activation and inhibition in coenzyme-substrate reactions. *Biochem. J.* 100, 491-500
- DETERMANN, H. (1967): *Gelchromatographie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- DRUM, D.E., J.H. HARRISON, T.K. LI, J.L. BETHUNE and B.L. VALLEE (1967): Structural and functional zinc in horse liver alcohol dehydrogenase. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 57, 1434-1440
- DRUM, D.E., T.K. LI and B.L. VALLEE (1969): Zinc isotope exchange in horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochem.* 8, 3792-3797
- DRUM, D.E. and B.L. VALLEE (1970): Optical properties of catalytically active cobalt and cadmium liver alcohol dehydrogenases. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 41, 33-39
- DRUM, D.E. and B.L. VALLEE (1970): Differential chemical reactivities of zinc in horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochem.* 9, 4078-4086
- DRUYAN, R. and B.L. VALLEE (1964): The effects of coenzyme and substrates on the rate of zinc exchange in horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochem.* 3, 944-949
- DUNN, G.R., T.G. WILSON and K.B. JACOBSON (1969): Age-dependent changes in alcohol dehydrogenase in *Drosophila*. *J. exp. Zool.* 171, 185-189
- EBISUZAKI, K. and E.S. GUZMAN BARRON (1957): Yeast alcohol dehydrogenase II. *Arch. Biochem. Biophys.* 69, 555-564
- EHRENBERG, A. and K. DALZIEL (1958): The molecular weight of horse liver alcohol dehydrogenase. *Acta chem. Scand.* 12, 465-469
- EULER, H.v., E. ADLER und H. HELLSTRÖM (1936): Über die Komponenten der Dehydrasesysteme. XII. Mechanismus der Dehydrierung von Alkohol und Triosephosphaten und der Oxydoreduktion. *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* 241, 239-271

- EVANS, N. and B.R. RABIN (1968): Inhibition studies on liver alcohol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 4, 548-554
- FROMM, H.J. and D.R. NELSON (1962): Ribitol dehydrogenase. III. Kinetic studies with product inhibition. *J. biol. Chem.* 237, 215-221
- GRAVES, J.M.H., A. CLARK and H.J. RINGOLD (1965): Stereochemical aspects of the substrate specificity of horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochem.* 4, 2655-2671
- GRELL, E.H., K.B. JACOBSON and J.B. MURPHY (1965): Alcohol dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*: Isozymes and genetic variants. *Science* 149, 80-82
- GRELL, E.H., K.B. JACOBSON and J.B. MURPHY (1968): Alterations of genetic material for analysis of alcohol dehydrogenase isozymes of *Drosophila melanogaster*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 151, 441-455
- HARRIS, I. (1964): Structure and catalytic activity of alcohol dehydrogenases. *Nature* 203, 30-34
- HAYES, J.E. jr. and S.F. VELICK (1954): Yeast alcohol dehydrogenase: Molecular weight, coenzyme binding, and reaction equilibria. *J. Biol. Chem.* 207, 225-244
- HOAGSTROM, C.W., I. IWEIBO and H. WEINER (1969): Interaction of coenzyme with differently prepared zinc-free (apo) horse liver alcohol dehydrogenase. *J. biol. Chem.* 244, 5967-5971
- HOCH, F.L. and B.L. VALLEE (1956): Kinetic studies on the role of zinc and diphosphopyridine nucleotide in the activity of yeast alcohol dehydrogenase. *J. biol. Chem.* 221, 491-499
- HOCH, F.L. and B.L. VALLEE (1960): Sulfhydryl groups of some mono- and dimercaptans and yeast alcohol dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 91, 1-5
- HOCH, F.L., R.J.P. WILLIAMS and B.L. VALLEE (1958): The role of zinc in alcohol dehydrogenases. II. the kinetics of the instantaneous reversible inhibition of yeast alcohol dehydrogenase by 1,10-phenanthroline. *J. biol. Chem.* 232, 453-464
- JACOBSON, K.B., J.B. MURPHY and F.C. HARTMAN (1970): Isozymes of *Drosophila* alcohol dehydrogenase. I. Isolation and interconversion of different forms. *J. biol. Chem.* 245, 1075-1083

- JACOBSON, K.B. and P. PFUDERER (1970): Interconversion of isoenzymes of *Drosophila* alcohol dehydrogenase. II. Physical characterization of the enzyme and its subunits. *J. biol. Chem.* 245, 3938-3944
- JOERNVALL, H. (1969): Differences in the primary structure between isoenzymes of horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 35, 542-547
- JOERNVALL, H. (1970): Differences in E and S chains from isoenzymes of horse liver alcohol dehydrogenase. *Nature* 225, 1133-1134
- JOERNVALL, H. (1970): Horse liver alcohol dehydrogenase. The primary structure of an N-terminal part of the protein chain of the ethanol-active isoenzyme. *Eur. J. Biochem.* 14, 521-534
- JOERNVALL, H. (1970): Horse liver alcohol dehydrogenase. The primary structure of the protein chain of the ethanol-active isoenzyme. *Eur. J. Biochem.* 16, 25-40
- JOERNVALL, H. (1970): Horse liver alcohol dehydrogenase. On the primary structure of the isoenzymes. *Eur. J. Biochem.* 16, 41-49
- JOERNVALL, H. (1970): Horse liver alcohol dehydrogenase. On the primary structure of the ethanol-active isoenzyme. *Eur. J. Biochem.* 13, 565-576
- KAPLAN, N.O. (1968): Nature of multiple molecular forms of enzymes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 151, 382-399
- KREBS, H.A. and J.R. PERKINS (1970): The physiological role of liver alcohol dehydrogenase. *Biochem. J.* 118, 635-644
- LI, T.K., D.D. ULMER and B.L. VALLEE (1962): Anomalous rotatory dispersion of enzyme complexes. III. Rotatory dispersion titration of liver alcohol dehydrogenase with coenzyme analogues and p-chloromercuribenzoate. *Biochem.* 1, 114-119
- LI, T.K., D.D. ULMER and B.L. VALLEE (1963): Anomalous rotatory dispersion of enzyme complexes. IV. Mechanism of inhibition of liver alcohol dehydrogenase by buffer anions and bases. *Biochem.* 2, 482-486
- LI, T.K. and B.L. VALLEE (1965): Reactivity and function of sulfhydryl groups in horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochem.* 4, 1195-1201
- LINEWEAVER, H. and D. BURK (1934): The determination of enzyme dissoziation constants. *J. Amer. chem. Soc.* 52, 658-665

- LOWRY, D.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* 193, 265-275
- LUTSDORF, U. and R. MEGNET (1968): Multiple forms of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Physiological control of ADH-2 and properties of ADH-2 and ADH-4. *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 933-944
- LUTSDORF, U.M. and J.P. von WARTBURG (1969): Subunit composition of horse liver alcohol dehydrogenase isoenzymes. *FEBS Letters* 5, 202-206
- LUTSDORF, U.M., P.M. SCHÜRCH and J.P. von WARTBURG (1970): Heterogeneity of horse liver alcohol dehydrogenase. Purification and characterization of multiple molecular forms. *Eur. J. Biochem.* 17, 497-508
- MANI, J.C., R. PIETRUSKO and H. THEORELL (1970): Methanol activity of alcohol dehydrogenases from human liver, horse liver and yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 140, 52-59
- MARKOVIC, C., H. THEORELL and S. RAO (1971): Rat Liver alcohol dehydrogenase. Purification and properties. *Acta chem. Scand.* 25, 195-205
- MAURER, H.R. (1968): Disc-Elektrophorese. Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Verlag Walter de Gruyter & Co, Berlin
- MERRITT, A.D. and G.M. TOMKINS (1959): Reversible oxidation of cyclic secondary alcohols by liver alcohol dehydrogenase. *J. biol. Chem.* 234, 2778-2782
- MOSER, K., J. PAPENBERG and J.P. von WARTBURG (1968): Heterogenität und Organverteilung der Alkoholdehydrogenase bei verschiedenen Spezies. *Enzym. biol. clin.* 9, 447-458
- NEGELEIN, E. und H.J. WULFF (1937): Kristallisation des Proteins der Acetaldehydreduktase. *Biochem. Z.* 289, 436-437
- NEGELEIN, E. und H.J. WULFF (1937): Dissoziationskonstanten und Reaktionsfähigkeit der Acetaldehydreduktase. *Biochem. Z.* 290, 445-446
- NEGELEIN, E. und H.J. WULFF (1937): Diphosphopyridinprotein, Alkohol und Acetaldehyd. *Biochem. Z.* 293, 351-389
- OPPENHEIMER, H.L., R.W. GREEN and R.H. MCKAY (1967): Function of zinc in horse liver alcohol dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 119, 552-559

- PAPENBERG, J., J.P.von WARTBURG und H.AEBI (1965): Die Heterogenität der Alkoholdehydrogenase aus Rhesusaffenleber. *Biochem. Z.* 342, 95-107
- PIETRUSKO, R., A. CLARK, J.M. GRAVES and H.J. RINGOLD (1966): The steroid activity and multiplicity of crystalline horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23, 526-534
- PIETRUSKO, R. and H. THEORELL (1969): Subunit composition of horse liver alcohol dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 131, 288-298
- PIETRUSKO, R., H.R. THEORELL, T.K. LI, B.L. VALLEE, A. AKESON and H. THEORELL (1969): Structure and function relationships in isoenzymes of horse liver alcohol dehydrogenase. *Nature* 221, 440-443
- PLANE, R.A. and H. THEORELL (1961): Liver alcohol dehydrogenase. IV. Kinetics in the presence of zinc binding agents. *Acta Chem. Scand.* 15, 1866-1874
- PLANE, R.A. and T.V. LONG (1963): Spectral observations concerning the binding of zinc in liver alcohol dehydrogenase. *Acta Chem. Scand.* 17, S91-S95
- PULLMAN, M.E., S.P. COLOWICK and N.O. KAPLAN (1952): Comparison of diphosphopyridine nucleotide with its deaminated derivative in various enzyme systems. *J. biol. Chem.* 194, 593-602
- REYNOLDS, C.H. and J.S. McKINLEY-McKEE (1969): Anion-binding to liver alcohol dehydrogenase, studied by rate of alkylation. *Eur. J. Biochem.* 10, 474-478
- REYNOLDS, C.H., D.L. MORRIS and J.S. McKINLEY-McKEE (1970): Complexes of liver alcohol dehydrogenase. Further studies on the rate of inactivation. *Eur. J. Biochem.* 14, 14-26
- REYNOLDS, C.H. and J.S. McKINLEY-McKEE (1970): Residual activity in carboxymethylated liver alcohol dehydrogenase. *Biochem. J.* 119, 801-802
- REYNIER, M. (1969): Pyrazole inhibition and kinetic studies of ethanol and retinol catalyzed by rat liver alcohol dehydrogenase. *Acta Chem. Scand.* 23, 1119-1129
- REYNIER, M., H. THEORELL and J. SJÖVALL (1969): Studies on the stereospecificity of liver alcohol dehydrogenase (LADH) for 3 β -hydroxy-5 β -steroids. Inhibition effect of pyrazole and of a 3 -hydroxy-cholanoic acid. *Acta Chem. Scand.* 23, 1130-1136

- SANDLER, N. and R.H. McKAY (1969): Zinc content and specific activity of horse liver alcohol dehydrogenase isoenzymes. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 35, 151-155
- SCHMIEDEBERG, O. (1881): *Arch. exptl. Pathol. Pharmacol.* Naunyn-Schmiedeberg's 14, 288
- Zit. n. SUND, H. and H. THEORELL (1963): Alcohol dehydrogenases. In BOYER, P.D., H. LARDY and K. MYRBÄCK (ed.): *The Enzymes* Vol. 7, p. 25-83, Acad. Press, New York, London
- SEGAL, H.L., J.F. KACHMAR and P.D. BOYER (1952): Kinetic analysis of enzyme reactions. I. Further considerations of enzyme inhibition and analysis of enzyme activation. *Enzymologia* 15, 187-198
- SHORE, J.D. and H. THEORELL (1966): Substrate inhibition effects in the liver alcohol dehydrogenase reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 117, 375-380
- SIGMAN, D.S. (1967): Interactions of substrates, inhibitor and coenzymes at the active site of horse liver alcohol dehydrogenase. *J. biol. Chem.* 242, 3815-3824
- SIGMAN, D.S. and A.D. WINTER (1970): The ternary complexes of fatty acid amides with horse liver alcohol dehydrogenase and NAD. *Biochim. biophys. Acta* 206, 183-186
- SNODGRASS, J.P., B.L. VALLEE and F.L. HOCH (1960): Effects of silver and mercurials on yeast alcohol dehydrogenase. *J. biol. Chem.* 235, 504-508
- SOFER, W. and H. URSPRUNG (1968): *Drosophila* alcohol dehydrogenase. Purification and partial characterization. *J. biol. Chem.* 243, 3110-3115
- SRERE, P.A. (1967): Enzyme concentrations in tissues. *Science* 158, 936-937
- SUND, H. and H. THEORELL (1963): Alcohol dehydrogenases. In BOYER, P.D., H. LARDY and K. MYRBÄCK (ed.): *The Enzymes* Vol. 7, p. 25-83, Acad. Press, New York, London
- THEORELL, H. and R. BONNICHSEN (1951): Studies on liver alcohol dehydrogenase. I. Equilibria and initial reaction velocities. *Acta Chem. Scand.* 5, 1105-1126
- THEORELL, H. and B. CHANCE (1951): Studies on liver alcohol dehydrogenase. II. The kinetics of the compound of horse liver alcohol dehydrogenase and reduced diphosphopyridine nucleotide. *Acta Chem. Scand.* 5, 1127-1124

- THEORELL, H., A.P. NYGAARD and R. BONNICHSEN (1955):
Studies on liver alcohol dehydrogenase. III. Influence of pH and
some anions on the reaction velocity constants. *Acta Chem.*
Scand. 9, 1148-1165
- THEORELL, H., S. TANIGUCHI, A. AKESON and L. SKURSKY (1966):
Crystallisation of a separate steroid-active liver alcohol dehy-
drogenase. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 24, 603-610
- URSPRUNG, H. and J. LEONE (1965): Alcohol dehydrogenases: Apoly-
morphism in *Drosophila melanogaster*. *J. exp. Zool.* 160,
147-154
- URSPRUNG, H. and L. CARLIN (1968): *Drosophila* alcohol dehydrogenase:
In vitro changes of isozyme patterns. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 151,
456-475
- VALLEE, B.L. and F.L. HOCH (1955): Yeast alcohol dehydrogenase,
a zinc metalloenzyme. *J. Amer. chem. Soc.* 77, 821-822
- VALLEE, B.L. and F.L. HOCH (1955): Zinc, a component of yeast alco-
hol dehydrogenase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 41, 327-338
- VALLEE, B.L. and F.L. HOCH (1957): Zinc in horse liver alcohol dehy-
drogenase. *J. biol. Chem.* 225, 185-195
- VALLEE, B.L. and T.L. COOMBS (1959): Complex formation of 1, 10-phe-
nanthroline with zinc ions and the zinc of alcohol dehydrogenase
of horse liver. *J. biol. Chem.* 234, 2615-2620
- VALLEE, B.L., R.J.P. WILLIAMS and F.L. HOCH (1969): The role
of zinc in alcohol dehydrogenase. IV. The kinetics of the instantane-
ous inhibition of horse liver alcohol dehydrogenase by 1, 10-
phenanthroline. *J. biol. Chem.* 234, 2621-2626
- WALLER, G. and H. THEORELL and J. SJÖVALL (1965): Liver alcohol
dehydrogenase as a 3 β -hydroxy-5 β -cholanic acid dehydrogenase.
Arch. Biochem. Biophys. 111, 671-684
- WALLENFELS, K. and H. SUND (1957): Über den Mechanismus der Was-
serstoffübertragung mit Pyridinnucleotiden. I. Freie SH-Grup-
pen und Aktivität bei Alkoholdehydrogenase aus Hefe. *Biochem.*
Z. 329, 17-30
- WALLENFELS, K., H. SUND, A. FAESSLER und W. BURCHARD (1957):
Über den Mechanismus der Wasserstoffübertragung mit Pyridin-
nucleotiden. II. Der minimale und maximale Zinkgehalt kristalli-
sierter Alkoholdehydrogenase aus Hefe. *Biochem. Z.* 329, 31-40
- WALLENFELS, K., H. SUND und H. DIEKMANN (1957): Über den Mecha-
nismus der Wasserstoffübertragung mit Pyridinnucleotiden. IV.
Hemmstoffe für DPN-abhängige Zinkenzyme. *Biochem. Z.* 329,
48-58

- WALLENFELS, K. und H. SUND (1957): Über den Mechanismus der Wasserstoffübertragung mit Pyridinnucleotiden. V. Das DPN-Bindungsvermögen von ADH und ZINK-ADH. *Biochem. Z.* 329, 59-74
- WALLENFELS, K. und H. SCHÜLY (1957): Über den Mechanismus der Wasserstoffübertragung mit Pyridinnucleotiden. VI. Die chemische Natur des Säureproduktes hydrierter Pyridiniumverbindungen und ein Vorschlag für einen Mechanismus der enzymatischen Reduktion von Brenztraubensäure und Phosphoglycerinsäure. *Biochem. Z.* 329, 74-82
- WARBURG, O. und W. CHRISTIAN (1936): Pyridin, der wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungsfermenten (Pyridinnucleotiden). *Biochem. Z.* 287, 291-328
- WARTBURG, J. P. von, J. L. BETHUNE and B. L. VALLEE (1964): Human liver alcohol dehydrogenase. Kinetic and physicochemical properties. *Biochem. J.* 93, 1775-1782
- WEINER, H. (1969): The role of zinc in liver alcohol dehydrogenase. In SARDESAI, V. M.: *Biochemical and clinical aspects of alcohol metabolism*, C. C. Thomas, Springfield, Illinois, USA
- WIEME, R. and M. RABAEY (1957): A new technique of quantitative ultramicroelectrophoresis. *Naturwiss.* 44, 112-113
- WINER, A. (1958): A note on the substrate specificity of horse liver alcohol dehydrogenase. *Acta Chem. Scand.* 12, 1695-1696
- WINER, A. D. and H. THEORELL (1959): Ternary complex formation of fatty acids and fatty acid amides with horse liver alcohol dehydrogenase-coenzyme complexes. *Acta Chem. Scand.* 13, 1038-1039
- WINER, A. D. and H. THEORELL (1960): Dissociation constants of ternary complexes of fatty acids and fatty acid amides with horse liver alcohol dehydrogenase-coenzyme complexes. *Acta Chem. Scand.* 14, 1729-1742
- WITTER, A. (1960): The binding of DPNH by liver alcohol dehydrogenase. *Acta Chem. Scand.* 14, 1717-1728
- WORONICK, C. L. (1961): Inhibition of liver alcohol dehydrogenase by amides. *Acta Chem. Scand.* 15, 2062-2064
- WORONICK, C. L. (1963): Spectrophotofluorometric determination of the dissociation constants of amides from the enzyme-reduced complex of liver alcohol dehydrogenase. *Acta Chem. Scand.* 17, 1789-1790

- WORONICK, C.L. (1963): Spectrophotofluorometric determination of the dissociation constants of relatively nonfluorescent liver alcohol dehydrogenase complexes with amides and coenzyme. *Acta Chem.Scand.* 17, 1791-1793
- ZACHMAN, R.D. and J.A. OLSON (1961): A comparison of retinene reductase and alcohol dehydrogenase of rat liver. *J.biol. Chem.* 236, 2309-2313

Lebenslauf

Am 21.12.1942 wurde ich, Etti Harms, als zweites Kind des am 10.10.1943 gefallenen Landwirts Dietrich Harms und seiner am 26.6.1950 verstorbenen Ehefrau Reenstine, geb. Dänekas, in Ihren, Kreis Leer, geboren. Dort besuchte ich von 1949 bis 1954 die Grundschule, anschließend den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig des Gymnasiums für Mädchen in Leer/Ostfriesland, an dem ich im März 1963 die Reifeprüfung ablegte.

Vom Sommersemester 1963 bis zum Wintersemester 1964/65 einschließlich studierte ich Biologie und Geographie an der Georg-August-Universität in Göttingen. Im Sommersemester 1965 wurde ich an der Freien Universität Berlin für die Fachrichtung Zoologie immatrikuliert und legte dort im Sommersemester 1968 die Diplom-Vorprüfung ab. Im Sommer 1969 begann ich mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertation am II. Zoologischen Institut der Freien Universität Berlin unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. K. Urich.

